

# **Detektion von Aminen auf Oberflächen**

## **mittels Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina

zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Simone Daniela Yvonne Reichstein

aus Ibbenbüren

1. Referent: Professor Dr. Karl-Heinz Gericke

2. Referent: Privatdozent Dr. Christof Maul

eingereicht am: 23.02.2015

mündliche Prüfung (Disputation): 10.04.2015

Druckjahr 2015

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Publikationen**

Reichstein S., Ehlers J.-E., Gericke K.-H. *Fluorescence Analysis for Amines on Plasma Functionalized Surfaces*, Thirteenth International Conference on Plasma Engineering, Extended Abstract, PO1070 (2012).

### **Tagungsbeiträge**

Reichstein S., Ehlers J.-E., Gericke K.-H. *Fluorescence Analysis for Amines on Plasma Functionalized Surfaces*, Thirteenth International Conference on Plasma Engineering, Garmisch-Partenkirchen (2012).

Reichstein S., Zellmer S., Garnweitner G., Gericke K.-H. *Fluorescence Analysis Methods for Stabilized Metal Oxid Nanoparticles in Dispersion*, Methods and Applications in Fluorescence, Genova (2013).

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	III
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theorie.....</b>	<b>6</b>
2.1 Absorption und Fluoreszenz.....	8
2.2 Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie .....	11
2.3 Fluoreszenzlebensdauer.....	19
2.4 Anisotropie .....	21
<b>3 Experimentelle Realisierung und Techniken.....</b>	<b>32</b>
3.1 Time correlated single photon counting (TCSPC) .....	32
3.2 Imaging.....	34
3.3 Anisotropie .....	36
3.4 Farbstofflabeling .....	39
3.4.1 Eigenschaften der angewendeten Farbstoffe .....	40
3.4.2 Kenntnisstand NBD-F .....	43
3.5 Datenauswertung .....	51
<b>4 Plasmaaminierte Hohlfasermembrane.....</b>	<b>53</b>
4.1 Herstellung und Anwendung.....	53
4.2 Labeling der Hohlfasermembrane .....	54
4.3 Querschnitts-Imaging von Aminogruppen auf plasmaaminierten Hohlfasermembranen .....	56
<b>5 Funktionalisierte Keramikröhrchen.....</b>	<b>63</b>
5.1 Herstellung und Anwendung.....	63



---

5.2	Labeling der Keramikröhrchen .....	66
5.3	3D Imaging von Aminogruppen auf funktionalisierten Keramikröhrchen .....	67
<b>6</b>	<b>Nanopartikel .....</b>	<b>80</b>
6.1	Herstellung und Anwendung .....	81
6.2	Bisheriger Wissensstand .....	83
6.3	Labeling Nanopartikel .....	86
6.4	Anisotropiemessungen an ITO-Nanopartikeln .....	89
6.4.1	<i>n</i> -Alkylamine .....	89
6.4.2	Diamine .....	110
6.5	Anisotropiemessungen an ZrO <sub>2</sub> -Nanopartikeln .....	128
6.5.1	Aminocarbonsäuren .....	128
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>147</b>
7.1	Poröse, funktionalisierte Oberflächen .....	147
7.2	Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Stabilisatormolekülen .....	152
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>164</b>
9.1	Imaging von Aminogruppen auf plasmaaminierten Hohlfasermembranen .....	164
9.2	3D Imaging von Aminogruppen auf Keramikröhrchen .....	166
9.3	Nanopartikel .....	171

## Abkürzungsverzeichnis

<b>AA</b>	Amylamin
<b>ADC</b>	Analog-Digital-Umsetzer
<b>AE-APTES</b>	<i>N</i> -(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysiloxan
<b>APD</b>	Avalanche-Photodiode
<b>APTES</b>	3-Aminopropyltriethoxysiloxan
<b>BuOH</b>	Butanol
<b>C12-NBD-PC</b>	1-Palmitoyl, 2-[-12-NBD-amino]hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<b>C6-NBD-PC</b>	1-Palmitoyl,2-[-6-NBD-amino]hexadecanoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<b>CFD</b>	constant function discriminator
<b>CHCl<sub>3</sub></b>	Chloroform
<b>DDA</b>	Dodecylamin
<b>DecOH</b>	Decanol
<b>DGL</b>	Differentialgleichung
<b>DLS</b>	Dynamische Lichtstreuung
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DPA</b>	Dreiphotonenanregung
<b>DPPC</b>	1,2-Dipalmitoyl- <i>sn</i> -glycero-3-phosphocholin
<b>EOH</b>	Ethanol
<b>EPA</b>	Einphotonenanregung
<b>EPM</b>	Einphotonenmikroskopie
<b>FWHM</b>	Halbwertsbreite
<b>GC</b>	Gaschromatographie
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Wasserstoffperoxid
<b>H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	Schwefelsäure
<b>HA</b>	Heptylamin
<b>HexOH</b>	Hexanol
<b>HPLC</b>	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
<b>ICT</b>	Intramolekularer Charge Transfer Zustand
<b>IEP</b>	Isoelektrischer Punkt
<b>IR</b>	infrarot
<b>IRF</b>	Instrument response function
<b>ISC</b>	Intersystem-Crossing
<b>ITC</b>	Titrationsskalometrie
<b>ITO</b>	Indiumzinnoxid
<b>LED</b>	Leuchtdiode

---

<b>LSM</b>	Lösungsmittel
<b>MHz</b>	Megahertz
<b>MNDO</b>	Modified Neglect of Differential Overlap
<b>NA</b>	Numerische Apertur
<b>NBD</b>	Nitrobenzofurazan
<b>NBDAHA</b>	( <i>N</i> -(7-nitrobenz-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-Hexansäure
<b>NBD-Cl</b>	4-Chlor-7-nitrobenzofurazan
<b>NBD-F</b>	4-Fluor-7-nitrobenzofurazan
<b>NBD-OH</b>	4-Hydroxy-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol
<b>NBD-PC</b>	Nitrobenzofurazan-phosphochiolin
<b>NMR</b>	Kernspinresonanz
<b>NOP</b>	<i>n</i> -Octyl-2-pyrrolidon
<b>OA</b>	Octylamin
<b>oLED</b>	Organische Leutdiode
<b>P</b>	Probe
<b>P(A)ES</b>	Polyarylethersulfon
<b>PA</b>	Pentylamin
<b>PD</b>	Photodiode
<b>PSF</b>	Pointspreadfunktion
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidon
<b>Q</b>	Quencher
<b>REM</b>	Rasterelektronenmikroskop
<b>STED</b>	Stimulated Emission Depletion
<b>TAC</b>	time-to-amplitude converter
<b>TCSPC</b>	Time correlated single photon counting
<b>TEM</b>	Transversale Mode
<b>TGA</b>	Thermogravimetrische Analyse
<b>Ti:Sa</b>	Titan-Saphir
<b>TICT</b>	verdrehter Intramolekularer Charge Transfer Zustand
<b>UV</b>	ultraviolett
<b>VIS</b>	sichtbar
<b>VR</b>	schnelle Relaxation
<b>YAG</b>	Neodym-Yttriumorthovanadat
<b>ZPA</b>	Zweiphotonenanregung
<b>ZPM</b>	Zweiphotonenmikroskopie
<b>ZrO<sub>2</sub></b>	Zirkoniumdioxid

# 1 Einleitung

In dieser Arbeit wird die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie für Fragestellungen aus dem Bereich der Materialwissenschaften eingesetzt. Ferner werden mit Hilfe dieser Mikroskopieart funktionalisierte Oberflächen, die zum Teil eine sehr poröse Struktur aufweisen und Nanopartikel untersucht.

Oberflächen spielen im Alltag eine große Rolle, wobei man unter einer Oberfläche je nach Fachgebiet etwas anderes versteht. Im Allgemeinen verstehen wir darunter die Begrenzung eines dreidimensionalen Körpers gegenüber seiner Umwelt. In der Mathematik steht der Begriff Oberfläche als Maß für eine Flächeneinheit, während der Computerfachman die Oberfläche als Teil eines interaktiven Systems zum Datenaustausch zwischen Maschine und Anwender sieht, eben als Benutzerschnittstelle. In der Physik und Chemie beschreibt die Oberfläche eine Grenzfläche zwischen zwei Phasen, beispielsweise zwischen einem Feststoff und einem Gas. In den Materialwissenschaften ist die Oberfläche hingegen als die zu bearbeitende Materialschicht klassifiziert, denn durch spezielle Beschichtungen können Oberflächen veredelt und mit neuen Eigenschaften ausgestattet werden.

Polymere, besitzen gute mechanische Eigenschaften und sind chemisch inert. Durch Einfügen von funktionellen Gruppen, wie zum Beispiel Aminogruppen, können diese chemisch modifiziert werden, so dass neue Eigenschaften entstehen. So werden in dieser Arbeit Hohlfasermembrane aus einem Copolymer aus Polyvinylpyrrolidon (PVP) und Polyarylethersulfon (P(A)ES) untersucht, die von der Gambro GmbH hergestellt werden und in der Medizintechnik als Plasmafilter zum Einsatz kommen. Diese Membranen sind in einem Plasmaprozess mit Aminen funktionalisiert worden, wodurch eine spezifische Absorption erreicht wird, die die Membranen dazu befähigt Blutplasma und Blutzellen voneinander zu trennen.

Nun ist es für diese Anwendung von großer Bedeutung, dass diese Funktionalisierung möglichst weit in die Membran hineinreicht und eine große Dichte von Aminogruppen auf den Membranen erzielt wird. Die in dieser Arbeit eingesetzte Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie bietet sich hervorragend an, diese Parameter zu ermitteln und kann somit als adäquates Hilfsmittel dienen, den Prozess der Plasmafunktionalisierung in Richtung homogener und weitreichender Aminofunktionalisierung weiter zu optimieren.

Durch ein Markierungsverfahren (im Folgenden „Labeling“ genannt) mit einem aminoselektiven Farbstoff können die Aminogruppen auf den Membranen markiert werden. Bei Anregung mit einem gepulsten Laser wird dieser Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und das am Detektor ankommende Fluoreszenzsignal ist proportional zur Aminogruppendichte. Da bei der Zweiphotonenanregung nur im direkten Fokuspunkt der Anregung Fluoreszenz erzeugt wird, können durch ein Scannen der Probe unter dem Mikroskop Querschnittsbilder oder dreidimensionale Tiefenprofile aufgenommen werden, durch dessen Auswertung die Aminogruppendichte von verschiedenen Proben miteinander verglichen und die Behandlungstiefen bestimmt werden können.

Einen weiteren Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Untersuchung von funktionalisierten Keramikmembranen. Keramische Materialien sind heutzutage in der Membrantechnologie nicht mehr weg zu denken.<sup>[KRO2010]</sup> Aufgrund ihrer chemischen, thermischen und mechanischen Stabilität haben sie hier die Membranen auf Basis von Polymeren weitestgehend abgelöst.<sup>[WER2014]</sup>

Am Institut Advanced Ceramics der Universität Bremen werden inerte Keramikmembranen zunächst durch eine Hydroxylierung aktiviert und dann mit 3-Aminopropyltriethoxysiloxan (APTES) und *N*-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysiloxan (AE-APTES) funktionalisiert. Ziel ist es, Mikroröhrchen zu entwickeln, die in der Trinkwasseraufbereitung eingesetzt werden können. Durch die Porenstruktur der Membranen soll ein Größenausschluss gegenüber krankmachender Viren erreicht werden. Die zusätzliche Funktionalisierung mit den aminogruppenhaltigen Substanzen APTES bzw. AE-APTES führt zu einem weiteren Effekt: die Viren können durch einen Adsorptionseffekt zurückgehalten werden.

Für eine zielführende Anwendung dieser Membrane in Entwicklungsländern ist es auch hier wichtig, Informationen über die Homogenität der Oberfläche, die Homogenität der Aminierung und deren Behandlungstiefe auf den Keramikröhrchen zu gewinnen, denn nur bei homogener und tiefer Aminierung ist eine gute Funktionalität der Filter im Einsatz gegen Viren gewährleistet. Auch hier eignet sich die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie bestens, um diese Informationen zu sammeln und den Entwicklungsprozess der Mikromembranen weiter voranschreiten zu lassen. So lassen sich auch hier die Amine mit einem Farbstoff markieren und dann mit einer Zweiphotonenanregung zur Fluoreszenz bringen. Gerenderte 3D Bilder aus Tiefenscans von der Innen- und Aussenseite dieser Membranröhrchen erlauben Aussagen über die obengenannten Parameter zu treffen.

Als großer Schwerpunkt wird in dieser Arbeit erstmals eine Methode aus der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie angewendet, um die Wechselwirkungen zwischen kleinen organischen Stabilisatormolekülen und der Oberfläche von metalloxidischen Nanopartikeln zu erforschen.

Am Institut für Partikeltechnik (IPAT) an der Technischen Universität Braunschweig werden unter anderem Nanopartikel auf Indiumzinnoxid (ITO)-Basis hergestellt. Damit diese in Primärpartikelgröße als Dispersion vorliegen, werden diese Partikel in einem post-synthetischen Verfahren mit Hilfe von Liganden stabilisiert. Als Liganden kommen dabei *n*-Alkylamine und Diamine zum Einsatz. Nach bisherigem Wissenstand sind die Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und den Stabilisatoren von schwacher Natur. Es werden van der Waals Wechselwirkungen angenommen.<sup>[GRO2012a]</sup> Ein weiteres Partikelsystem an welchem in diesem Institut geforscht wird, bilden die Zirkonoxid ( $\text{ZrO}_2$ ) Nanopartikel. Hier erfolgt die Stabilisierung durch Carbonsäuren und im Gegensatz zum ITO-Partikelsystem bindet der Stabilisator hier sehr wahrscheinlich kovalent an den Partikel an.<sup>[GRO2012b]</sup>

Ziel der Untersuchungen in dieser Arbeit ist es, weitere Informationen zum Prozess der Stabilisierung und den auftretenden Wechselwirkungen zwischen Partikel und Stabilisator zu gewinnen, als es bisher durch die dynamische Lichtstreuung (DLS), Thermogravimetrische Analysen (TGA) und Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie geschehen ist. Zumindest sollen durch eine weitere unabhängige Methode die bisherigen Erkenntnisse bestätigt werden. So soll in dieser Arbeit getestet werden, ob eine zeitaufgelöste Anisotropiemessung eine geeignete Methode der Wahl ist, um die Wechselwirkungen zwischen Partikel und Stabilisatormolekül zu charakterisieren. Da die mit der Partikeloberfläche wechselwirkenden Stabilisatormoleküle keine Eigenfluoreszenz zeigen, werden diese ebenfalls wieder mit einem aminogruppenselektiven Farbstoff markiert.

Um herauszufinden, ob sich die Wechselwirkungen zwischen Partikel und Stabilisator auf das Fluoreszenzverhalten auswirken, wird zunächst die Fluoreszenzlebensdauer des reinen Stabilisatormoleküls in Lösung mit der Fluoreszenzlebensdauer einer stabilisierten Partikeldispersion verglichen. Wirkt sich die Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator auf die Fluoreszenzlebensdauer aus, dann kann diese als Maß für die Stärke dieser Wechselwirkungen herangezogen werden. Daraus folgend sollte es möglich sein, auch die Einflüsse der Kettenlänge des verwendeten Stabilisators, wie auch dessen Mengenverhältnis gegenüber den Partikeln, auf die Partikelstabilisierung zu untersuchen.

Die Durchführung von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen eröffnet die Möglichkeit zur Bestimmung weiterer Größen, wie die Rotationskorrelationszeit der Stabilisatormoleküle. Diese sollte durch eine Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator in den Partikellösungen deutlich länger sein als in den reinen Stabilisatorlösungen, da der Partikel die Beweglichkeit des Stabilisatormoleküls, an dem das Farbstoffmolekül angekoppelt ist, einschränkt. Mit Hilfe von Anisotropiemessungen könnte es also möglich sein, starke Wechselwirkungen, die die Beweglichkeit der Stabilisatormoleküle einschränken, aufzudecken und zusätzlich einen Hinweis auf die Größe des angebundenen Partikels zu erhalten und somit auch festzustellen, wie homogen die Partikelgrößenverteilung in einer Partikeldispersion ist. Zusätzlich ist es eventuell möglich, die räumliche Anordnung der Stabilisatormoleküle auf der Partikeloberfläche zu untersuchen, die vertikal oder horizontal sein kann.

Das alles sind wichtige Aspekte, die für die Optimierung der Synthese von homogenen Partikeldispersionen, zur Anwendung in den verschiedensten Bereichen der Medizin oder Elektrotechnik, wichtig sind.

In dieser Arbeit werden die Vorteile der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie also vorrangig für Anwendungen aus dem Bereich der Prozessoptimierung oder der Grundlagenforschung zum Stabilisierungsprozess von Nanopartikeldispersionen in den Materialwissenschaften eingesetzt. Es soll gezeigt werden, dass neben den vielen Fragestellungen aus dem Bereich der Biologie auch die Materialwissenschaften von dieser Mikroskopieart profitieren können.

Möglich wird dies erst durch wichtige Erfindungen und Erungenschaften der letzten Jahrzehnte. So wurde das physikalische Prinzip der Multiphotonenanregung bereits im Jahre 1931 erstmals von Maria Göppert-Mayer hervorgesagt.<sup>[GOE1931]</sup> Erst 30 Jahre später wurde mit dem Rubinlaser der erste Laser entwickelt. Bereits ein Jahr danach gelang es dann 1961 zum ersten Mal die Zweiphotonen-Fluoreszenzanregung experimentell zu beobachten.<sup>[KAI1961]</sup>

Im Jahr 1990 haben Denk, Strickler und Web das erste Laserrastermikroskop mit Zweiphotonenanregung aufgebaut.<sup>[DEN1990]</sup> Seitdem können die Vorzüge der Zweiphotonenanregung dazu genutzt werden, um Proben dreidimensional zu untersuchen, wobei das Fluoreszenzsignal aus einem kleinen Volumen in der Größenordnung von Attolitern kommt.<sup>[XU1996]</sup>

Seit 1990 sind weitere Entwicklungen im Bereich der Multiphotonenmikroskopie erreicht worden. So wurde das 4Pi-Mikroskop erstmals von Hell beschrieben und aufgebaut.<sup>[Hel1992]</sup>

Auch das STED-Mikroskop (Stimulated Emission Depletion-Microscope) wurde 1994 von Hell theoretisch beschrieben und im Jahre 1999 von Klar und Hell umgesetzt.<sup>[HEL1994], [KLA1999]</sup> Beide Mikroskope führen zu einer deutlichen Verbesserung der Auflösung, bis hinab zu wenigen Nanometern. Nicht verwunderlich, dass Hell im Jahre 2014 den Nobelpreis für Chemie für seine ausserordentlichen Errungenschaften auf dem Gebiet der Mikroskopie erhalten hat.

Diese Arbeit ist wie folgt gegliedert: Im theoretischen Teil werden Grundlagen für das Verständnis und zur Durchführung der Experimente mittels Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie gegeben.

Im experimentellen Teil werden die verwendeten Techniken und Mikroskopaufbauten beschrieben. Anschließend erfolgt eine allgemeine Einführung in das Farbstofflabeling, die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe werden erläutert und ein Einblick in den bisherigen Wissenstand in der Anwendung des Farbstoffs 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) wird gegeben. Am Ende des dritten Kapitels wird auf die Datenauswertung näher eingegangen.

Die folgenden Kapitel sind dann nach den oben genannten Anwendungsgebieten benannt:

Kapitel 4 beschäftigt sich mit den plasmaanimierten Hohlfasermembranen. In Kapitel 5 werden die Untersuchungen an den funktionalisierten Keramikröhrchen vorgestellt, während in Kapitel 6 auf die Anisotropiemessungen an den Nanopartikelsystemen eingegangen wird. Bevor in diesen Kapiteln die Ergebnisse dokumentiert und diskutiert werden, werden zuvor die Herstellungsprozesse und Anwendungsgebiete der Proben genauer vorgestellt. Anschließend wird auf das spezifische Labeling der Fluoreszenzproben und die Probenvorbereitung eingegangen.

In Kapitel 7 werden die Ergebnisse zusammengefasst und Hinweise für zukünftige Untersuchungen gegeben.



## 2 Theorie

In diesem Kapitel sollen die wichtigsten, für das Verständnis dieser Arbeit notwendigen, theoretischen Grundlagen erklärt werden. Dazu gehören die Vorgänge der Absorption und Fluoreszenz, sowie die Fluoreszenzlebensdauer. Da alle Messungen in dieser Arbeit mit einem Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskop durchgeführt wurden, nimmt die Beschreibung dieser noch recht neuen Mikroskopieart im Vergleich zu der schon sehr verbreiteten Einphotonen-Fluoreszenzmikroskopie in diesem Kapitel einen großen Abschnitt ein. Desweiteren kommt der Fluoreszenzanisotropie in dieser Arbeit ein großer Stellenwert zu, weshalb sie Gegenstand von Unterkapitel 2.5 ist.

Alle diese Punkte haben eines gemeinsam: sie beruhen darauf, dass Licht ausgesendet wird und mit Materie wechselwirkt. Die Ausbreitung des Lichts kann man sich dabei einmal als zeitliche und räumliche Ausbreitung von Lichtwellen vorstellen. Hierbei besteht das Licht aus einem elektrischen und einem magnetischen Feld, welche senkrecht zueinander stehen. Verläuft die Ausbreitungsrichtung senkrecht zu den beiden Feldvektoren, so spricht man von einer Transversalwelle.

Die allgemeine Wellengleichung für eine elektromagnetische Welle leitet sich aus den Maxwellgleichungen ab und ist in Gleichung 2.1 dargestellt.

$$\vec{E}(\vec{x}, t) = \vec{E}_0 e^{i(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \phi)} = \vec{E}_0 [\cos(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \phi) + i \cdot \sin(\omega t - \vec{k}\vec{x} + \phi)] \quad (2.1)$$

Die erste Form entspricht der komplexen Exponentialschreibweise, während die zweite Form die trigonometrische Schreibweise zeigt.  $\vec{E}(\vec{x}, t)$  ist der orts- und zeitabhängige Vektor des elektrischen Feldes,  $E_0$  die Amplitude der Welle. Die Ausbreitungsrichtung der Welle ist  $x$ , und  $\vec{k}$  entspricht dem Wellenvektor in Ausbreitungsrichtung. Die Kreisfrequenz ist durch  $\omega$  gegeben. Eine Verschiebung der Wellenoszillation wird durch den Phasenterm  $\phi$  deutlich gemacht.

Die Polarisation des Lichts ist vor allem in der in dieser Arbeit angewendeten Fluoreszenzanisotropie von großer Bedeutung und soll hier kurz beschrieben werden. Die Sonne als sehr große thermische Lichtquelle, aber auch die klassische Glühlampe senden unpolarisierte Lichtwellen aus, d.h. der elektrische Feldvektor dieser Lichtwellen hat keine bevorzugte Orientierung. Anders ist es zum Beispiel bei den Lichtwellen, die ein Laser aussendet. Diese sind kohärent und weisen eine Vorzugsrichtung auf, sie sind meist linear

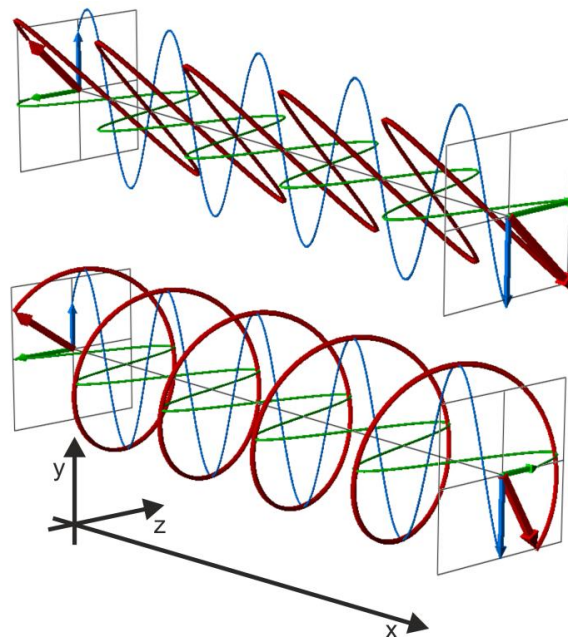
polarisiert. Bei einer transversalen Lichtwelle ist eine Schwingungsrichtung des elektrischen Feldes durch den Vektor  $\vec{k}$  gegeben, nämlich senkrecht zur Ausbreitungsrichtung  $x$ . Zur vollständigen Beschreibung der Schwingungsrichtung des elektrischen Feldes fehlen noch die  $y$  und  $z$  Komponenten (Gleichung 2.2).

$$\vec{E}(x, t) = \vec{E}_z + \vec{E}_y = \begin{pmatrix} 0 \\ E_{y0} \cos(\vec{k}x - \omega t + \varepsilon) \\ E_{z0} \cos(\vec{k}x - \omega t) \end{pmatrix} \quad (2.2)$$

Hierin beschreibt  $\varepsilon$  die Phasendifferenz der beiden Komponenten. Bei einer Phasendifferenz von  $0^\circ$ , oder einem ganzzahligen Vielfachen von  $2\pi$ , wird linear polarisiertes Licht erhalten. Beide Komponenten schwingen in Phase. Wird im späteren Verlauf dieser Arbeit von horizontal oder vertikal linear polarisiertem Licht gesprochen, so ist dies eine reine Definitionsangelegenheit, denn beide Fälle unterscheiden sich nur durch eine Phasendifferenz von  $180^\circ$ , oder einem ungeraden ganzzahligen Vielfachen von  $2\pi$ . Eine weitere Polarisationsmöglichkeit ist die rechts-bzw. linkszirkulare Polarisation in der der Vektor des elektrischen Feldes eine Kreisbahn beschreibt. Hier ist  $\varepsilon = \pi/2 + m\pi$ , mit  $m = 0, 1, 2, \dots$ .

Da in dieser Arbeit aber nur mit linear polarisiertem Anregungslicht gearbeitet wird, soll an dieser Stelle keine weitergehende Beschreibung der Zirkularpolarisation erfolgen.

Abbildung 2-1 zeigt eine linear polarisierte Lichtwelle und eine zirkular polarisierte Lichtwelle mit ihren Komponenten  $E_y$  und  $E_z$  des elektrischen Feldes im Vergleich.

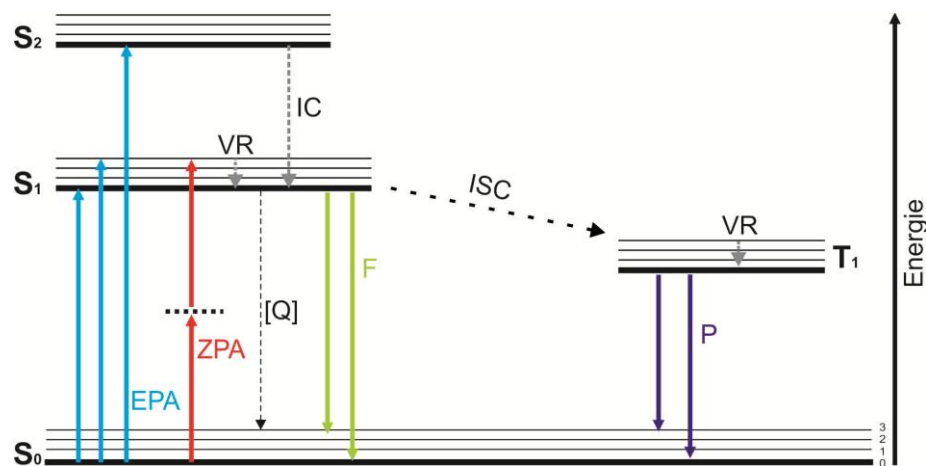


**Abb. 2-1** linear polarisierte Welle oben, zirkular polarisierte Welle unten – blau beschreibt die  $y$ -Komponente des elektrischen Feldvektors, grün die  $z$ -Komponente, rot entspricht der resultierenden Welle. Gezeichnet mit dem Programm EMANIM.

## 2.1 Absorption und Fluoreszenz

Ein Molekül kann sich in unterschiedlichen Energiezuständen befinden. Dabei wird zwischen elektronischen, Rotations- und Schwingungszuständen unterschieden. Zu einem elektronischen Zustand gehören mehrere Schwingungszustände, während ein einzelner Schwingungszustand selbst wieder in verschiedene Rotationszustände untergliedert ist.

Moleküle befinden sich normalerweise im Grundzustand ( $S_0$ ). Sie können aber durch die Einstrahlung von elektromagnetischer Strahlung, d.h. von Photonen auf ein höheres Energieniveau ( $S_n$ ) angeregt werden, wenn der Energiebetrag der Differenz beider Zustände entspricht (diskrete Zustände). Diesen Vorgang bezeichnet man als Absorption. Dabei nimmt das Molekül die Energie des Photons ( $E = h \cdot \nu$ ) vollständig auf und gelangt dann mit Hilfe der zugesetzten Energie vom Grundzustand in einen angeregten Zustand. Der Anregung schließt sich meist durch Lumineszenz die Emission von Strahlung an. Zur Lumineszenz gehören die beiden Prozesse Fluoreszenz und Phosphoreszenz. Da das Phänomen der Fluoreszenz in dieser Arbeit eine grundlegende Rolle spielt, sollen die Ereignisse, die letztendlich zu der Fluoreszenz eines Moleküls führen, wie auch die dazu konkurrierenden Prozesse im Folgenden etwas näher beschrieben werden. Einen guten Überblick gibt das Jablonski-Diagramm in Abb. 2-2.



**Abb. 2-2** Jablonski-Diagramm eines Moleküls im Singulett-Grundzustand

Darin stellen  $S_0$ ,  $S_1$  und  $S_2$  den elektronischen Grundzustand und den ersten, bzw. zweiten angeregten Zustand dar. Jeder dieser Zustände besitzt zusätzlich Vibrationszustände (mit 0,1,2,3 markiert), deren Besetzungswahrscheinlichkeit bei einer Anregung durch das Franck-Condon Prinzip gegeben ist. Meist erfolgt die Anregung in den ersten ( $S_1$ ) oder zweiten ( $S_2$ ) angeregten Singulett-Zustand, wobei auch eine Anregung in vibronisch angeregte Zustände möglich ist (siehe blaue Pfeile). Von dort findet jedoch durch Stöße der Moleküle mit der

molekularen Umgebung eine schnelle Relaxation (VR) in den Schwingungsgrundzustand des angeregten Singulett-Zustands statt.

Auch die Anregung in den  $S_2$  Zustand ist nicht von langer Dauer, denn dieser wird durch innere Konversion (IC, einem strahlungslosen Prozess) in der Zeitskala von Pikosekunden entvölkert und führt zu einem angeregten  $S_1$  Zustand, so dass die sich anschließende Fluoreszenz immer aus einem  $S_1$  Energieniveau erfolgt.

Die Anregung muss nicht zwanghaft durch ein einzelnes Photon erfolgen (sogenannte Einphotonenanregung, EPA), sondern kann z.B. auch durch zwei Photonen über ein virtuelles Zwischenniveau erreicht werden (rote Pfeile).<sup>[LAK2006]</sup> Die Gesamtenergie der beiden Photonen entspricht derer bei einer Einphotonenanregung. Man kann also den gleichen Zustand mit einem 400 nm Photon, oder aber mit zwei 800 nm Photonen anregen, sofern es die Auswahlregeln erlauben.

Die Zweiphotonenanregung (ZPA) birgt einige Herausforderungen, da der Prozess nicht sehr wahrscheinlich ist, bietet aber auch einige Vorteile und wird, da sie Gegenstand dieser Arbeit ist, im nächsten Unterkapitel genauer betrachtet.

Die Fluoreszenz erfolgt immer aus dem Vibrationsgrundzustand des  $S_1$  Zustands, kann aber auch in einem angeregten Schwingungszustand des Grundzustands ( $S_0$ ) enden (grüne Pfeile). Der Prozess der Fluoreszenz emittiert Strahlung, diese ist durch den sogenannten Stokes-Shift langwelliger (energieärmer) als der Prozess der Anregung. Dies kommt durch die bereits angesprochene innere Konversion und die schnelle Relaxation von einem angeregten Schwingungszustand in den Schwingungsgrundzustand zu Stande.

Die Fluoreszenz ist ein erlaubter Übergang und deshalb in der Lebensdauer des angeregten Zustands sehr kurz. Typische Fluoreszenzlebensdauern liegen im Bereich von 0,5-10 ns (Die Fluoreszenzlebensdauer ist Gegenstand von Kapitel 2.4). Es gibt mehrere Prozesse, die in Konkurrenz zur Fluoreszenz stehen, so dass nicht alle angeregten Photonen auch wieder emittiert werden. So kann die Anregungsenergie z.B. durch innere Konversion wieder abgebaut werden. Des Weiteren können Stöße mit anderen Molekülen, sogenannte Quencher (Q), dazu führen, dass der angeregte Zustand destabilisiert wird und weniger Fluoreszenzlicht emittiert wird (näheres in Kapitel 2.4). Das angeregte Elektron aus  $S_1$  kann eine Spinumkehr wiederfahren und über ein Intersystem-Crossing (ISC) in den ersten angeregten Triplettzustand über wechseln, welcher energetisch etwas niedriger liegt als der  $S_1$  Zustand. Der sich daran anschließende Übergang von  $T_1$  in  $S_0$  ist spin-verboten. Deshalb ist dieser eher unwahrscheinlich und typische Lebenszeiten für die Phosphoreszenz liegen somit bei Mikrosekunden bis hin zu Minuten. Phosphoreszenz tritt vornehmlich bei Molekülen mit

schweren Atomen auf, da dort die Spin-Umkehr durch eine stärkere Spin-Bahn-Kopplung ermöglicht wird.

Damit ein Molekül überhaupt angeregt werden kann, muss das entsprechende Übergangsdipolmoment ungleich Null sein. Das Übergangsdipolmoment  $\mathbf{M}_{if}$  zeigt also an, wie wahrscheinlich die Absorption eines Photons ist. Gleichung 2.3 beschreibt die allgemeine Form des Übergangsdipolmoments.<sup>[McC1974]</sup>

$$\mathbf{M}_{if} = \int \Psi_i^*(\mathbf{r}) \cdot \mathbf{r} \cdot \Psi_f(\mathbf{r}) d\tau_r \neq 0 \quad (2.3)$$

Dabei ist das  $\mathbf{r}$  der Dipolmomentoperator,  $\Psi_i$  steht für die Wellenfunktion des initialen Zustands und  $\Psi_f$  für die Wellenfunktion des finalen Zustands.

Bei einer Einphotonenanregung vereinfachen sich das  $\mathbf{r}$  zum permanenten Dipolmoment des Moleküls und das  $\mathbf{M}_{if}$  zum Übergangsdipolmoment, beides sind Vektoren. Die Stärke des Übergangs ergibt sich dann nach McCain<sup>[McC1974]</sup> für die EPA zu:

$$\sigma \propto |\boldsymbol{\lambda} \cdot \mathbf{M}_{if}|^2. \quad (2.4)$$

Bei einer Zweiphotonenabsorption hängt der Dipolmomentoperator zusätzlich von der Polarisierbarkeit des Moleküls ab. Deshalb hat man den Zweiphotonentensor  $\mathbf{S}_{if}$  (Gleichung 2.5) eingeführt.<sup>[McC1974]</sup> Dieser beschreibt die Kombinationsmöglichkeiten der unterschiedlichen Polarisierungen der Photonen mit dem Übergangsdipolmoment des Moleküls.

$$\mathbf{S}_{if} = \begin{bmatrix} S_{xx} & S_{xy} & S_{xz} \\ S_{yx} & S_{yy} & S_{yz} \\ S_{zx} & S_{zy} & S_{zz} \end{bmatrix} \quad (2.5)$$

Somit ergibt sich die Stärke des Übergangs einer ZPA zu:

$$\delta \propto |\boldsymbol{\lambda} \cdot \mathbf{S}_{if} \cdot \boldsymbol{\mu}|^2. \quad (2.6)$$

Wobei  $\sigma$  und  $\delta$  die entsprechenden Absorptionsquerschnitte darstellen, und  $\boldsymbol{\lambda}$  und  $\boldsymbol{\mu}$  die Polarisierung der Photonen anzeigen. Man erkennt eine quadratische Abhängigkeit des Absorptionsquerschnitts vom Übergangsdipolmoment bzw. vom Zweiphotonentensor. Eine genauere Auseinandersetzung mit dem Übergangsdipolmoment und dem Zweiphotonentensor ist in der Literatur zu finden.<sup>[McC1972], [McC1974]</sup>

Die Symmetrien der Wellenfunktionen im Grundzustand  $\Psi_i$  und im angeregten Zustand  $\Psi_f$  bestimmen, ob Gleichung 2.3 ungleich Null ist und somit ob der Übergang erlaubt ist. Aus der Gruppentheorie lassen sich Auswahlregeln ableiten, die Auskunft über die Erlaubnis eines

Übergangs geben. Dazu gehören die Drehimpulserhaltung, die Pseudoparitätsregel und die Laporte-Regel. Die Auswahlregeln sind in Tabelle 2.1 dargestellt. Da bei einer ZPA zwei Photonen absorbiert werden, ergeben sich dort auch andere Auswahlregeln. Das heißt: ein Übergang, der in der EPA verboten ist, kann in der ZPA erlaubt sein und umgekehrt.

**Tab. 2.1** Auswahlregeln für die Einphotonen- und Zweiphotonenanregung

Auswahlregel	EPA	ZPA
<b>Drehimpulserhaltung</b>	$\Delta J = 0, \pm 1$	$\Delta J = 0, \pm 1, \pm 2$
<b>Laporte-Regel</b>	$u \leftrightarrow g$	$u \leftrightarrow u, g \leftrightarrow g$
<b>Pseudoparitätsregel</b>	$+\leftrightarrow -$	$+\leftrightarrow +, -\leftrightarrow -$

Bei großen Molekülen, bzw. schweren Atomen kann die Symmetrie des Moleküls durch vibronische Kopplungen erniedrigt werden, sodass auch normal verbotene Übergänge stattfinden können.<sup>[LAK2006]</sup> In einem Molekül mit Inversionszentrum ist ein  $g \leftrightarrow g$  Übergang bei der EPA beispielsweise durch die Laporte-Regel verboten. Ein schweres Atom in diesem Molekül kann aber zu einer asymmetrischen Schwingung führen und somit das Inversionszentrum aufheben. Der Übergang wird schwach erlaubt. Bei d-d Übergängen in Metallen treten diese vibronischen Übergänge häufig auf.

## 2.2 Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie

Die Möglichkeit einen energetisch angeregten Zustand auch mit zwei Photonen, der sogenannten Zweiphotonenanregung (ZPA) zu erreichen wurde bereits in Kapitel 2.1 erwähnt und ist in Abb. 2-2 dargestellt worden. Die gegenüber der Einphotonenanregung (EPA) veränderten Auswahlregeln für die Erlaubnis von energetischen Übergängen innerhalb eines Moleküls wurden in Kapitel 2.1 ebenfalls kurz vorgestellt (Tab. 2.1). In diesem Kapitel soll nun genauer auf die Anwendung der ZPA in der Fluoreszenzmikroskopie und den sich daraus ergebenden Möglichkeiten und Vorteilen gegenüber der EPA in der Fluoreszenzmikroskopie eingegangen werden, aber auch die Schwierigkeiten in der experimentellen Umsetzung sollen erwähnt werden.

Als die ZPA 1931, weit vor der Entwicklung des ersten Lasers durch Theodore Maiman im Jahre 1960<sup>[MAI1960]</sup>, von Maria Goeppert-Mayer erstmals vorhergesagt wurde<sup>[GOE1931]</sup>, sollte es noch Jahrzehnte dauern bis diese experimentell bestätigt werden konnte. Göppert-Mayer gelang es mit Hilfe der Diracschen Dispersionstheorie<sup>[DIR1927]</sup> die Wahrscheinlichkeit der

simultanen Emission von zwei Lichtquanten zu berechnen. Die ZPA beschreibt sie als Umkehrprozess der Simultanemission.<sup>[GOE1931]</sup>

1961 war es dann soweit, Kaiser und Garrett führten Messungen zur Fluoreszenz eines mit Europium dotierten Calcium-Fluorid-Kristalls durch und hatten die Fluoreszenz erstmals mit einer ZPA hervorgerufen.<sup>[KAI1961]</sup>

1990 wurde durch Denk, Strickler und Web das erste Laserrastermikroskop mit ZPA aufgebaut.<sup>[DEN1990]</sup> Seit dem steigen die Anwendungsfelder der Zwei- oder Mehrphotonen-Mikroskopie rasant an. Vor allem bei biologischen Fragestellungen kommt die recht neue Technik zum Einsatz. Diese Arbeit soll zeigen, dass diese Technik auch in den Materialwissenschaften zu neuen Erkenntnissen führen kann, in dem sie an Nanopartikeln und anderen funktionalisierten Oberflächen angewendet wird. Einen Einstieg in die Anwendung der Zweiphotonenmikroskopie in der Materialwissenschaft gibt die Arbeit von Ehlers (2011)<sup>[EHL2011]</sup>, die sich mit der Untersuchung von polymeren Systemen beschäftigt.

Bei der ZPA werden zwei Photonen simultan absorbiert, das virtuelle Zwischenniveau ist sehr kurzlebig ( $\sim 10^{-16}$  Sekunden). In dieser Zeit müssen beide Photonen mit dem Molekül wechselwirken. Da die Wahrscheinlichkeit für diese schnelle Wechselwirkung sehr gering ist, sind für die ZPA sehr hohe Photonenflussdichten erforderlich, welche erst seit der Entwicklung moderner Laser, wie z.B. dem Titan-Saphir Laser, erzielt werden können.

Die Wahrscheinlichkeit  $W$  für eine ZPA ist von den Intensitäten  $I$  der beiden Photonen abhängig (Gleichung 2.7)

$$W \sim I_1 \cdot I_2 \quad (2.7)$$

Für die in dieser Arbeit verwendete ZPA mit zwei Photonen gleichen Energiegehalts ist die Übergangswahrscheinlichkeit proportional zum Quadrat der Gesamtintensität. Die ZPA ist ein nicht-linearer Prozess, der sich auch im Absorptionsquerschnitt deutlich von der EPA unterscheidet. In Gleichung 2.8 ist die Anzahl der absorbierten Photonen pro Zeit ( $NA_1$ ) als Funktion des Photonenflusses  $\phi$  für die EPA gegeben<sup>[LAK2006]</sup>.

$$NA_1 = \sigma_1 \cdot \phi \quad (2.8)$$

Wobei  $\sigma_1$  der Absorptionsquerschnitt der EPA ist und in  $\text{cm}^2$  angegeben wird.  $NA$  hat allgemein die Dimension Photonen pro Sekunde und ist somit eine Geschwindigkeitskonstante. Der Photonenfluss  $\phi$  wird in Photonen pro Quadratzentimeter pro Sekunde angegeben ( $\text{Photonen}/\text{cm}^2\text{s}$ ). Gleichung 2.9 zeigt entsprechendes für die ZPA<sup>[LAK2006]</sup>.

$$NA_2 = \sigma_2 \cdot \phi^2 \quad . \quad (2.9)$$

Hierbei beschreibt  $\sigma_2$  den Absorptionsquerschnitt der ZPA und hat die Einheit  $\text{cm}^4/\text{s}/\text{Photon}$ . Beispielhaft soll auch auf den Absorptionsquerschnitt der Dreiphotonenanregung (DPA) eingegangen werden (Gleichung 2.10), deren Anregungswahrscheinlichkeit noch einmal deutlich geringer ist.

$$NA_3 = \sigma_3 \cdot \phi^3 \quad (2.10)$$

In der DPA ergibt sich die Dimension für den Absorptionsquerschnitt  $\sigma_3$  zu  $\text{cm}^6\text{s}^2/\text{Photon}$ . Die Absorptionsquerschnitte verkleinern sich also durch die Anregung mit steigender Anzahl der anregenden Photonen (ZPA, DPE,...), sodass ausreichend hohe Absorptionsraten erst mit extrem hohen Photonenflüssen erreicht werden, welche experimentell nur mit gepulsten Lasern erzielt werden können. Typische Absorptionsquerschnitte liegen bei  $\sigma_1 = 10^{-16} \text{ cm}^2$ ,  $\sigma_2 = 10^{-48} \text{ cm}^4\text{s}$  und  $\sigma_3 = 10^{-83} \text{ cm}^6\text{s}^2$ . [LAK2006]

Obwohl durch die Auswahlregeln mit der ZPA andere Zustände angeregt werden als mit der EPA liefern bisher alle Fluoreszenzuntersuchungen von Fluorophoren, die mit ZPA angeregt wurden gleiche Emissionsspektren oder Fluoreszenzlebensdauern wie bei einer EPA. Dies lässt sich darauf zurückführen, dass die Emission der Fluoreszenz immer vom vibronischen Grundzustand des  $S_1$  Zustands erfolgt, egal in welches höhere Energieniveau zuvor angeregt wurde (Kapitel 2.1). [LAK2006]

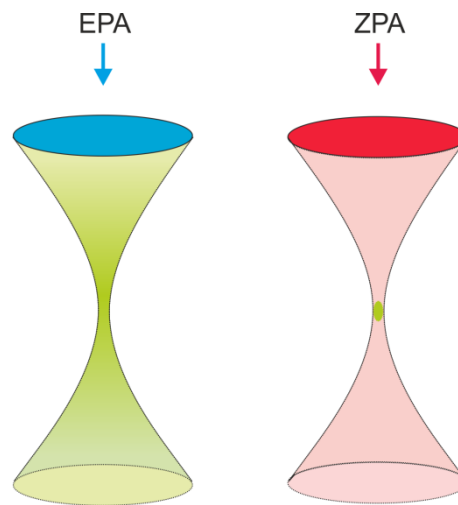
Heutzutage wird für die meisten Anwendungen ein konfokales Laser Scanning Mikroskop verwendet, in dem Anregungs- und Fluoreszenzlicht den gleichen optischen Weg passieren. Zum einen wird das Anregungslicht durch das Objektiv in die Probe hinein in einem Punkt fokussiert und zugleich sammelt das Objektiv die von der Probe ausgesendete Fluoreszenz ein. An einem dichroitischen Strahlteiler kann dann das Fluoreszenzlicht vom Anregungslicht getrennt werden und den Weg zum Detektor nehmen. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroskopaufbauten sind in Kapitel 3 aufgeführt.

Die ZPA bietet im Vergleich zur EPA einige Vorteile, die im Folgenden genannt werden und hat sich deshalb für die Anwendungen innerhalb dieser Arbeit als vorteilhaft angeboten.

Obwohl aufgrund der geringen Anregungswahrscheinlichkeit und der dadurch erforderlichen hohen Photonenflussdichte relativ teure Instrumente, wie z.B. ein gepulster Ti:Sa Laser für die Realisierung einer ZPA erforderlich sind, kann dies auch als ein Vorteil angesehen werden. Denn während in der EPM (Einphotonenmikroskopie) die Photonenflussdichte im gesamten Anregungsvolumen hoch genug ist, kommt es in der ZPM (Zweiphotonenmikroskopie) nur im direkten Fokus des Anregungslichts zu einer für die



Anregung ausreichenden Photonenflussdichte und einer ausreichenden räumlichen Konzentration (Abb. 2-3.).



**Abb. 2-3** Vergleich EPA (links) und ZPA (rechts): Bei EPA Anregung mit 400nm (blau) und Fluoreszenz (grün) im gesamten Doppelkegelvolumen, bei ZPA Anregung bei 800 nm (rot) und Fluoreszenz (grün) nur im Fokuspunkt

Verwendet man einen scan-fähigen Laserstrahl, oder einen scan-fähigen Probenstisch, so kann man mit Hilfe der ZPM Proben dreidimensional ab rastern, da nur in der Fokalebene angeregt wird. Dies bedeutet, dass andere Bereiche außerhalb der Fokalebene nicht angeregt werden und dort kein Bleicheffekt auftreten kann, während gerade eine darunter liegende Ebene in der Probe vermessen wird. In der EPM hingegen werden auch Probenbereiche außerhalb der Fokalebene angeregt, während gerade Aufnahmen von der Fluoreszenz in der Fokusebene gemacht werden. Werden anschließend Aufnahmen in den anderen Bereichen gemacht, fällt dort die Fluoreszenzintensität geringer aus, da dort zuvor bereits ein Teil der Fluorophore angeregt wurde.

Der Einsatz von Lochblenden kann in der EPA helfen, die Anregung außerhalb der Fokalebene einzuschränken. Bei optisch dichten Proben hilft dies jedoch nicht ausreichend und die ZPA spielt auch dort ihren Vorteil aus, dass nur in einem kleinen Spot (sub-Femtoliter Volumen) die Voraussetzungen für eine Anregung erfüllt werden. Denn durchquert das Anregungslicht eine optisch dichte Probe um in dessen Tiefe Fluoreszenz anzuregen, so wird bei der EPM bereits oberhalb der Fokalebene ein Teil des Anregungslichts von der Probe absorbiert. Dies bedeutet, dass die Leistung des Anregungslichts in der Fokalebene im Vergleich zu optisch transparenten Proben, erniedrigt ist und somit niedrigere Fluoreszenzintensitäten gemessen werden. In der EPA ist die Fluoreszenzintensität also von der Weglänge abhängig, die der Laserstrahl durch die Probe zurück legen muss.

Da für die ZPA Photonen mit der halben Energiemenge und somit der doppelten Wellenlänge verwendet werden als bei der EPA, kommt es bei der ZPM zu einer geringeren Streuung. Denn Übergänge, die sonst im UV- oder VIS-Bereich angeregt werden, können dank ZPA nun im IR-Bereich angeregt werden, wo die Rayleigh-Streuung sehr viel geringer ausfällt. Die Stärke des Streueffekts hängt von der Wellenlänge  $\lambda$  des eingestrahlt Lichts ab ( $\sim \lambda^{-4}$ ) [DIA2006], so dass blaues Licht 16-mal stärker gestreut wird als die in der ZPA verwendete IR-Strahlung. So können mit der ZPA auch höhere Eindringtiefen in die Probe erreicht werden. Die Forscher Theer et al. (2003) konnten zum Beispiel in Gehirnen von Mäusen bereits in vivo Messungen bis in eine Tiefe von 1000  $\mu\text{m}$  vornehmen und stellten dabei eine Abhängigkeit der Eindringtiefe von der Wiederholrate fest. [THE2003]

Bei Anregung im UV-Bereich werden biologische Proben durch die energiereiche Strahlung leicht zerstört. Diesem wirkt die ZPM im IR-Bereich entgegen. Der mittlere Energieeintrag in die Probe ist bei der ZPM sehr gering, weshalb ein Aufheizen der Probe durch den Anregungsstrahl vernachlässigt werden kann. So kann man mit der ZPA beispielsweise Langzeitmessungen an lebenden Zellen durchführen.

Bei den zum Teil hohen Spitzenleistungen aufgrund des gepulsten Betriebs des Lasers ist es jedoch möglich, dass Schädigungen an der Probe während dieser Spitzenleistungen auftreten, weshalb darauf zu achten ist, nicht mit mehr Laserleistung anzuregen, als für die Anregung erforderlich ist. Hopt und Neher (2001) haben Untersuchungen zu Strahlungsschäden durch ZPA an chromaffinen Zellen der Nebenniere von Rindern durchgeführt, wobei die  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration und die Zelldegranulierung als Indikatoren für Strahlungsschäden herangezogen wurden. Dabei stellten sie einen nicht-linearen Effekt fest. In der Anwendung unter normalen Bedingungen, mit geringer Laserleistung treten keine Strahlungsschäden auf, doch überschreitet man eine bestimmte Grenze in der Laserleistung, so treten plötzlich starke Schäden auf. Dabei sind die eintretenden Schäden  $\sim$  proportional zu  $I^{2,5}$ , wobei  $I$  die räumlich und zeitlich integrierte Laserleistung ist. Für typische Strahlparameter und Messbedingungen (wie z.B. Objektiv NA = 0,9, Pulsbreite 150 fs, Wiederholrate 80 MHz, Verweildauer des Strahls an einer Stelle 10 msec, Wellenlänge 800 nm) können bei einer Laserleistung von 2,5 mW in der Probenebene bis zu 2500 Scans durchgeführt werden, bis es zu einer Schädigung kommt. Bei einer Leistung von 10 mW können hingegen nur noch 77 Scans durchgeführt werden. So dass die beiden Forscher empfehlen bei biologischen Proben eine Laserleistung von 2,5 mW in der Probenebene nicht zu überschreiten. [HOP2001]

Für die in dieser Arbeit ausschließlich nicht-biologischen Proben ist dieser Sachverhalt jedoch nicht ganz so entscheidend.

Da im IR-Bereich angeregt wird und die meisten Fluorophore im sichtbaren Bereich emittieren, liegen Anregungs- und Fluoreszenzlicht spektral weit genug auseinander, um diese beiden durch den Einsatz von Spektralfiltern gut voneinander trennen zu können und somit auch störende Hintergrundsignale zu minimieren und ein besseres Signal-Rausch Verhältnis zu erreichen.

In der Anwendung der ZPM als Imagingtechnik, um Proben intrinsisch dreidimensional zu rastern, ist es wichtig die Auflösungsgrenzen des Systems zu kennen. Allgemein ist das Auflösungsvermögen eines optischen Instruments durch das Rayleigh Kriterium charakterisiert. Es definiert den Abstand  $d$ , den zwei Lichtpunkte gerade noch voneinander haben dürfen, damit sie getrennt voneinander wahrgenommen werden können. Dabei darf der Abstand zwischen beiden nicht kleiner sein, als das Intensitätsmaximum des einen Punktes in das Intensitätsminimum des anderen herein ragt.<sup>[BOR1980]</sup> Nach Abbe ist das Auflösungsvermögen von der verwendeten Wellenlänge  $\lambda$  und der numerischen Appertur  $NA$  des Objektivs abhängig<sup>[CRE2011]</sup> (Gleichung 2.11).

$$d = \frac{\lambda}{2 \cdot NA} \quad (2.11)$$

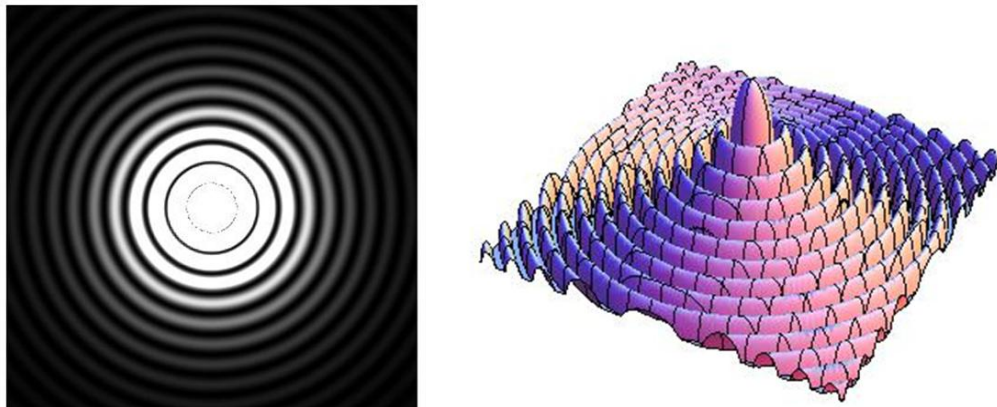
mit:  $NA = n \cdot \sin \alpha \quad (2.12)$

Wobei  $n$  für den Brechungsindex des Immersionsmediums steht und  $\alpha$  für den halben Öffnungswinkel des verwendeten Objektivs. Vergleicht man rein nach Formel (2.11) das Auflösungsvermögen eines Einphotonenmikroskops (EPM) mit dem eines ZPMs, so ist das der ZPM nur halb so gut wie das der EPM, da bei der ZPM die doppelte Wellenlänge verwendet wird. Dem ist aber nicht so, denn es gibt viele weitere Faktoren, die das effektive Auflösungsvermögen bestimmen. Für das Auflösungsvermögen nach Gleichung (2.11) wird für die EPM zum Beispiel ein perfektes, konfokales Mikroskop mit einer unendlich kleinen Lochblende angenommen.<sup>[GU1995]</sup> Dies lässt sich in der Praxis jedoch nicht verwirklichen, so dass der Unterschied in der Auflösung zwischen EPM und ZPM durch die Verwendung einer realen Lochblende in der EPM geringer wird. Einen weiteren Einfluss ergibt die tatsächliche Photonenzahl pro Bildpixel. In der EPM gelangen, neben den Photonen des eigentlichen Signals aus dem Messvolumen, eine Vielzahl weiterer, gestreuter Photonen, außerhalb des Fokus zum Detektor, da das Anregungsvolumen viel größer ist (Abbildung 2-3). Durch dieses Rauschen wird der Bildkontrast vermindert. Da in der ZPM die Fluoreszenz nur aus dem direkten Fokus stammt, werden dort viel weniger Photonen gestreut.

Um die tatsächliche Auflösung zu bestimmen ist es wichtig die Größe des Anregungsvolumens zu kennen. Für eine gute Auflösung sollte die Emission des anregenden Laserstrahls in seiner räumlichen Intensitätsverteilung der Grundmode TEM<sub>00</sub> (transversale Mode) entsprechen, damit keine Knotenebenen im Strahlprofil auftreten und der Strahl einen symmetrischen, gaußförmigen Intensitätsverlauf aufweist und die Rückapertur des Mikroskops gut ausgeleuchtet werden kann. Bei der Fokussierung durch Linsen oder Objektive kommt es generell zu Beugungseffekten (Huygen'sches Prinzip), so dass es nicht möglich ist Lichtstrahlen in einem Punkt zu fokussieren. Deshalb wurde die Pointspreadfunktion (PSF) eingeführt, die diese Abbildungsfehler durch Beugungseffekte erfasst. Sie beschreibt das laterale Beugungsmuster als Airy-Scheibe, deren Form sich in Gleichung 2.13 wieder gibt<sup>[BOR1980], [PEA2013]</sup>:

$$I(r) = I_{r=0} \left[ \frac{J_1(2\pi r)}{\pi r} \right]^2 \quad . \quad (2.13)$$

$I(r)$  steht für die radiale Intensitätsverteilung,  $r$  für den Radius und  $J_1$  ist die Besselfunktion erster Gattung und erster Ordnung.



**Abb. 2-4** Berechnetes Beugungsbild (Airy-Scheibe) in logarithmischer Auftragung – Dichte der Intensitätsverteilung (links) und 3D-Auftragung (rechts)

Für die ZPM wird wegen des nicht-linearen Verhaltens aufgrund der ZPA die quadrierte PSF ( $PSF^2$ ) verwendet.<sup>[SHE1990]</sup> Durch die Arbeit von Richards und Wolf (1959)<sup>[RIC1959]</sup> ist es möglich die  $PSF^2$  zu bestimmen und mit einer Gaußfunktion zu fitten, so dass die laterale und axiale Auflösung erhalten wird. So ergibt aus der Gaußanpassung an die normale PSF die maximal erreichbare laterale Auflösung  $\omega_{xy}$  zu:

$$\omega_{xy} = \frac{1.22\lambda}{2n \cdot \sin \alpha} = \frac{0,61\lambda}{NA} \quad . \quad (2.14)$$

Und für die ZPM aus der  $PSF^2$  die maximal erreichbare Auflösung in lateraler und axialer ( $\omega_z$   $\omega_{xy}$ ) Richtung zu <sup>[ZIP2003]</sup>:

$$\omega_{xy} = \frac{0,325\lambda}{\sqrt{2} \cdot NA^{0,91}} \quad (2.15)$$

$$\omega_z = \frac{0,532\lambda}{\sqrt{2}} \left[ \frac{1}{n - \sqrt{n^2 - NA^2}} \right] , \quad (2.16)$$

Wobei die laterale Auflösungsgrenze nur für Objektive mit einer NA größer 0,7 gilt. Da in dieser Arbeit jedoch nur Objektive mit größerer NA verwendet wurden, ist dieser Fall ausreichend. Diese Auflösungsgrenzen zeigen an, wann der an die quadrierte PSF angepasste Gaußfit den Wert 1/e angenommen hat. Nimmt man außerdem an, dass die  $PSF^2$  einem dreidimensionalen Gauss-Volumen angenähert werden kann, so lässt sich mit Hilfe von  $\omega_{xy}$  und  $\omega_z$  das Fokalvolumen  $V_{ZPA}$  der ZPA berechnen. <sup>[ZIP2003]</sup>

$$V_{ZPA} = \pi^{3/2} \omega_{xy}^2 \omega_z \quad (2.17)$$

Für das in dieser Arbeit meist verwendete Objektiv (Zeiss EC Plan-Neofluar 40x, NA 1,30, Ölimmersion) und Immersionsöl (Zeiss Immersol 518 N, n=1,518) ergeben sich daraus beispielhaft folgende lateralen und axialen Auflösungsgrenzen, sowie Anregungsvolumen für eine Anregungswellenlänge von 850 nm:  $\omega_{xy} = 167$  nm,  $\omega_z = 210$  nm und  $V_{ZPA} = 1,25 \cdot 10^{-20}$  m<sup>3</sup>, bzw. 125 Attoliter. Dabei ist Gleichung 2.16 nur eine Näherung und beschreibt nur das Zentrum der  $PSF^2$  gut. Die äußeren Lappen der Funktion gehen nicht in die integrierte Gaußfunktion ein. So dass das nach Gleichung 2.17 bestimmte Volumen etwa 68% des Volumens entspricht, welches durch die numerische Integration des gesamten vektoriellen Ansatzes von Richards und Wolf <sup>[RIC1959]</sup> erhalten wird. <sup>[ZIP2003]</sup>

Führt man in Gleichung 2.17 den Korrekturfaktor von 0,68 ein, so ergibt sich für  $V_{ZPA}$  ein korrigierter Wert von 184 Attolitern für das Anregungsvolumen des Mikroskopaufbaus in dieser Arbeit. Berechnet man mit den gleichen Daten exemplarisch das laterale Auflösungsvermögen eines EPMs, so ergibt sich mit ca. 400 nm eine deutlich schlechtere Auflösung. Dies wäre nach alleiniger Betrachtung von Formel 2.11 nach Abbe nicht verifizierbar gewesen und zeigt noch einmal auf, wie wichtig es ist, neben der verwendeten Wellenlänge und der Objektiveigenschaften auch andere Faktoren heran zu ziehen, denn genau in diesen Faktoren unterscheidet sich die EPM von der ZPM.

### 2.3 Fluoreszenzlebensdauer

Als Fluoreszenzlebensdauer wird die mittlere Verweildauer eines Moleküls im angeregten Zustand verstanden, bevor dieses durch Emission eines Photons wieder in den Grundzustand zurück kehrt. Die resultierende Fluoreszenz erfolgt meistens aus dem  $S_1$  Zustand. Bei der Entvölkerung des angeregten Zustands treten neben der Fluoreszenz aber auch andere konkurrierende Prozesse auf, die strahlungslos erfolgen. Die Entvölkerung des angeregten Zustands lässt sich mit einer Differentialgleichung (DGL) erster Ordnung beschreiben (Gleichung 2.18).

$$\frac{dN}{dt} = -(k_F + \sum k_{nr}) \cdot N \quad (2.18)$$

Dabei steht  $N$  für die Anzahl der angeregten Moleküle und  $k_F$  bzw.  $k_{nr}$  sind die Geschwindigkeitskonstanten des Fluoreszenzzerfalls, bzw. der strahlungslosen Prozesse. Da die Intensität der Fluoreszenz proportional zu der Zahl der angeregten Moleküle ( $N$ ) ist, kann man durch Integration von Gleichung 2.18 eine Beschreibung für die zeitaufgelöste Fluoreszenzintensität herleiten, in die die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  eingeht (Gleichung 2.19).

$$F(t) = F_0 \cdot e^{-\frac{t}{\tau}} \quad (2.19)$$

Man erhält eine Fluoreszenzabklingkurve (Abbildung 2-5), in der  $F$  für die zeitabhängige Fluoreszenzintensität steht und  $F_0$  für die Fluoreszenz zum Zeitpunkt der Anregung, d.h. bei  $t = 0$ . Die Fluoreszenzlebensdauer ist darin als Kehrwert der Prozesse definiert, die den angeregten Zustand entvölkern, also als:

$$\tau = \frac{1}{k_F + \sum k_{nr}} \quad (2.20)$$

Die Fluoreszenzlebensdauer ist unabhängig von der Fluoreszenzintensität und Konzentration des Fluorophors, zeigt jedoch sensitives Verhalten auf Änderung der Mikroumgebung des Fluorophors, sei es durch Änderungen der Viskosität, Polarität, der Ionenstärke oder des pH-Wertes, um ein paar Beispiele zu nennen.<sup>[FER1993], [HEI2001], [BOR2005], [TAK2008], [YU2008]</sup>

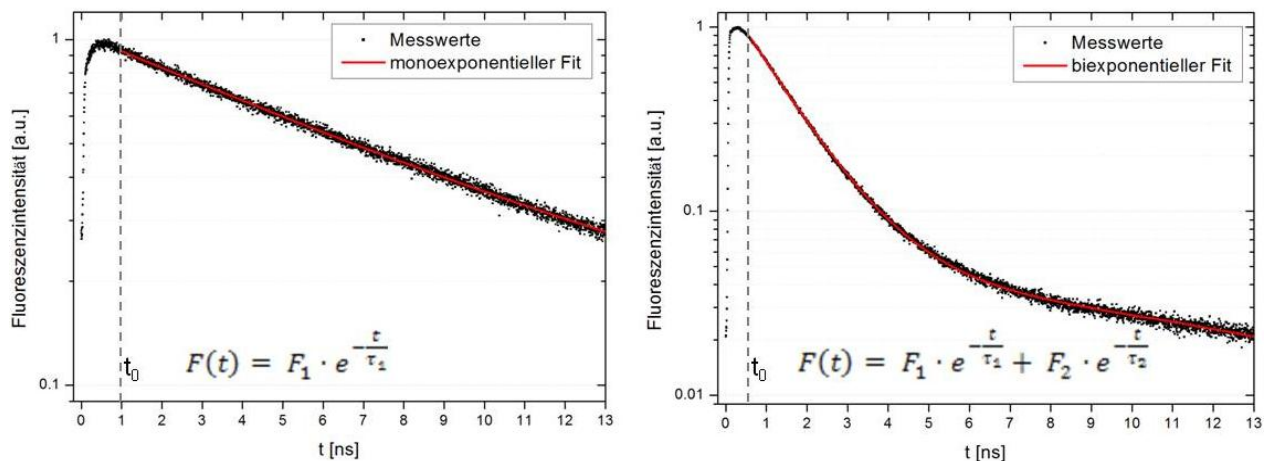
Aufgrund dieses sensitiven Verhaltens eignen sich Fluoreszenzlebensdauermessungen sehr gut um Änderungen in der Mikroumgebung eines Fluorophors sichtbar zu machen. In dieser Arbeit soll die Bestimmung der Lebensdauer unter anderem Auskünfte über Wechselwirkungen von Nanopartikeln mit ihren Stabilisatormolekülen geben.

Der Fluoreszenzzerfall muss allgemein nicht monoexponentiell sein, wie in Gleichung 2.19 dargestellt, sondern kann auch multiexponentielles Abklingverhalten zeigen. Entweder weil

mehrere verschiedene Fluorophore im Messvolumen vorhanden sind, bzw. mehrere Zustände angeregt werden, oder aber weil ein Fluorophor in verschiedenen Umgebungen vorkommt und der angeregte Zustand in diesen Umgebungen unterschiedlich stabil ist. Dabei ist es schwer mehr als drei Komponenten aufzulösen, da dies nur gelingt, wenn sich die einzelnen Komponenten ausreichend stark voneinander unterscheiden. Bei einem multiexponentiellen Fluoreszenzverhalten gehen die Einzelfluoreszenzen additiv in die Gesamtfluoreszenz ein (Gleichung 2.21).

$$F(t) = \sum_i F_i \cdot e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (2.21)$$

Dabei stehen die  $F_i$  für den Anteil der Einzelfluoreszenz an der Gesamtfluoreszenz. Die Summe aller  $F_i$  sollte über eine Normierung 1 ergeben.



**Abb. 2-5** mono- (links) und biexponentielle (rechts) Fluoreszenzabklingkurven in der logarithmischen Auftragung mit den entsprechenden Funktionen

Es gibt verschiedene Prozesse, die die Fluoreszenz eines Fluorophors beeinflussen können und somit auch die Fluoreszenzlebensdauer betreffen. Prozesse, die die Fluoreszenz erniedrigen und auch die Lebensdauer herab setzen können, werden unter dem Begriff Fluoreszenzquenching zusammen gefasst. Allgemein lässt sich sagen, dass das Quenchen dazu führt, dass die strahlungslosen Prozesse stark zunehmen und den angeregten Zustand schnell entvölkern, oder aber, dass die Bevölkerung des angeregten Zustands ganz verhindert wird.

Es wird zwischen statischen und dynamischen Quenching unterteilt. Beim statischen Quenchen bildet der Fluorophor mit dem Quencher-molekül einen nicht fluoreszierenden Komplex. Beim dynamischen Quenchen kommt es zu Stößen zwischen Fluorophor und Quencher-molekülen. Durch diese Stöße findet ein Energietransfer zwischen Fluorophor und

Quencher statt, in dem ein Teil der Energie des angeregten Zustands strahlungslos auf das quenchende Molekül übertragen wird. Für beide Arten des Quenchings ist der Kontakt beider Spezies (Fluorophor und Quencher) Voraussetzung, weshalb Quenchingprozesse nur bei hohen Konzentrationen an Fluorophor (self-Quenching) und bzw. oder Quencher-molekülen auftreten.

Der Quencher muss es schaffen innerhalb der Lebensdauer des angeregten Zustands nah genug an den Fluorophor heran zu diffundieren. Man sagt, dass der Abstand zwischen beiden ungefähr 40 Å betragen muss.<sup>[LAK2006]</sup> Um einen solchen Abstand zu erreichen, muss die Konzentration der Fluorophore im Millimol-Bereich ( $10^{-3}$  M) liegen. Normalerweise werden Fluoreszenzmessungen im Konzentrationsbereich von  $10^{-6}$  M (Mikromol) durchgeführt, also deutlich unterhalb der erforderlichen Konzentration für Quenching. Für das dynamische Quenchen ist die Abhängigkeit der Fluoreszenz von der Quencherkonzentration in der Stern-Volmer Gleichung (Gleichung 2.22) beschrieben.<sup>[LAK2006]</sup>

$$\frac{F_0}{F} = 1 + k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + K_D \cdot [Q] \quad (2.22)$$

Hierbei beschreibt  $F_0$  die Fluoreszenzintensität ohne Anwesenheit eines Quenchers und  $F$  die Fluoreszenzintensität bei Anwesenheit von Quencher-molekülen. Das  $k_q$  ist die Geschwindigkeitskonstante des Quenchingprozesses und  $\tau_0$  ist die Fluoreszenzlebensdauer ohne Quenching. Die Konzentration des Quenchers geht als  $Q$  in die Gleichung ein. Das  $k_q$  und  $\tau_0$  ergeben zusammen die Stern-Volmer Konstante  $K_D$ . Die Gleichung zeigt eine lineare Abhängigkeit des Quenchens von der Konzentration der Quencher-moleküle.

## 2.4 Anisotropie

Regt man einen Fluorophor mit polarisiertem Licht an, so zeigt dieser oftmals auch eine polarisierte Emission. Diese wird durch die Anisotropie beschrieben. Der Ursprung liegt in den Übergangsdipolmomenten für die Absorption und die Emission. Die Absorptionsdipolmente haben eine spezifische Ausrichtung innerhalb der Fluorophorstruktur. Bei Anregung einer Lösung aus zufällig orientierten Fluorophoren, werden die Fluorophore, deren Absorptionsübergangsdipolmoment parallel zum elektrischen Vektor des Anregungslichts ausgerichtet ist, bevorzugt angeregt. Diese Auslese nennt sich Photo-selektion.

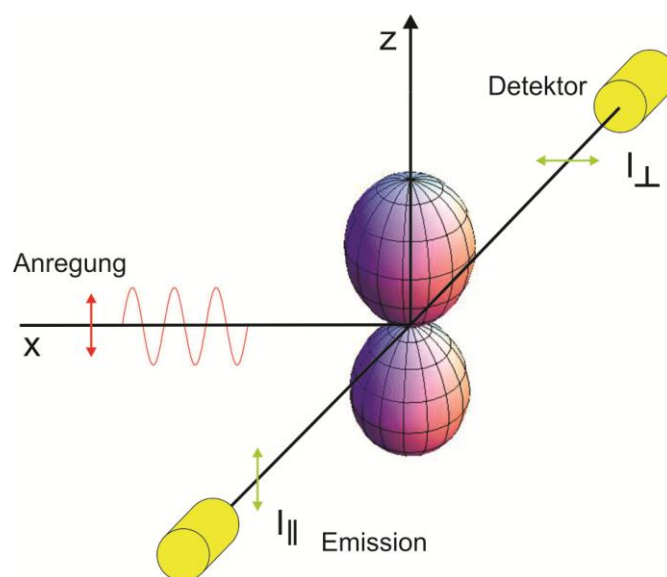
Die Anisotropie  $r$  ist allgemein als das Verhältnis der Differenz zwischen dem parallel zur Anregungspolarisation in z-Richtung polarisierten Fluoreszenzkanal und dem dazu senkrecht



polarisierten Fluoreszenzkanal zur Gesamtfluoreszenz in alle drei Raumrichtungen definiert (Gleichung 2.23)

$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}} = \frac{I_z - I_y}{I_z + I_x + I_y} \quad (2.23)$$

Hier steht  $I_{\parallel}$  für den parallel zum Anregungslicht polarisierten Detektionskanal und  $I_{\perp}$  für den senkrecht zum Anregungslicht polarisierten Detektionskanal. Da die Differenz beider Detektionskanäle durch die Gesamtintensität geteilt wird, ist  $r$  normalisiert und somit unabhängig von der absoluten Fluoreszenzintensität. Abbildung 2.6 zeigt schematisch die Messung der Fluoreszenzanisotropie nach dem T-Format Aufbau.



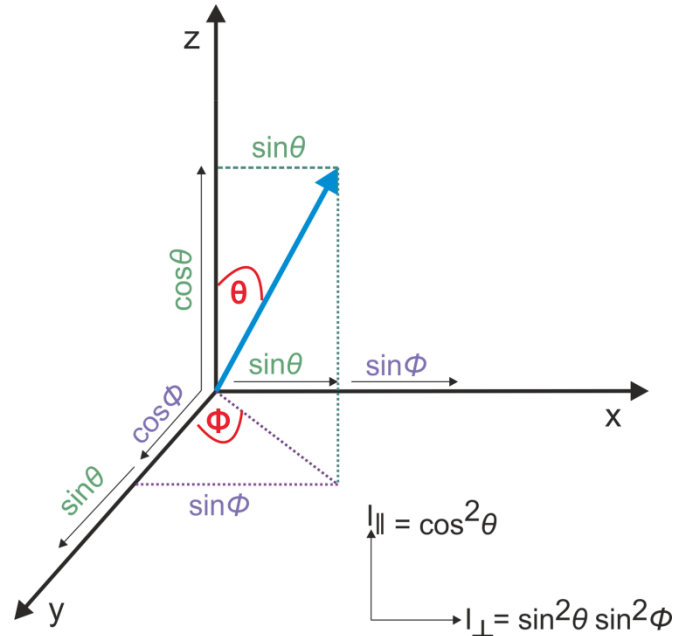
**Abb. 2-6** Schematische Darstellung für Anisotropiemessungen im T-Format mit Polarkoordinatendarstellung der Anregungsdipolmomente der photoselektierten Fluorophore

Dabei wird mit vertikal zur Ausbreitungsrichtung polarisiertem Licht angeregt und mit Hilfe von zwei Detektoren beide Fluoreszenzkanäle (parallel und senkrecht) zeitgleich aufgenommen. Die Hantel zeigt die Verteilung der photoselektierten Anregungsdipolmomente der Fluorophore in Polarkoordinatendarstellung. Eine genaue Beschreibung des verwendeten Messaufbaus erfolgt in Kapitel 3.3.

Als nächstes soll beschrieben werden, wie sich die beiden Intensitätskanäle, aus denen die Anisotropie  $r$  (siehe Gleichung 2.17) errechnet wird zusammen setzen. Dazu stellt man sich am einfachsten zunächst nur ein einziges Molekül mit parallel zueinander stehenden Absorptions- und Emissionsdipolmomenten in einem Koordinatensystem vor.

Abbildung 2-7 zeigt das Übergangsmoment des Moleküls (blauer Vektor) in einem dreidimensionalen Koordinatensystem. Die Orientierung des Übergangsmoments zur z-Achse

ist durch den Winkel  $\theta$  bestimmt. Der Winkel  $\phi$  beschreibt die Orientierung zur y-Achse. Wird mit parallel zur z-Achse polarisiertem Licht angeregt, so wird der Intensitätskanal  $I_{\parallel}$  durch die Projektion des Übergangsmomentes auf die z-Achse bestimmt. Der Intensitätskanal  $I_{\perp}$  wird analog durch die Projektion auf die x-y-Ebene beschrieben.



**Abb. 2-7** Übergangsdipolmoment eines einzelnen Moleküls in einem Koordinatensystem zur Bestimmung der Intensitätskanäle der Emission

So ergibt sich eine zu  $\cos\theta$  proportionale Abbildung auf die z-Achse und eine zu  $\sin\theta$  und  $\sin\phi$  proportionale Abbildung des Übergangsmomentes auf die x-Achse. Dem entsprechend ergeben sich für die Fluoreszenzintensitäten die folgenden quadratischen Abhängigkeiten:

$$I_{\parallel}(\theta, \phi) = \cos^2 \theta \quad (2.24)$$

$$I_{\perp}(\theta, \phi) = \sin^2 \theta \sin^2 \phi . \quad (2.25)$$

Lässt man nun die Vereinfachung weg fallen, dass nur ein einziges Molekül betrachtet wird, sondern kehrt zurück zu einer Lösung aus zufällig orientierten Fluorophoren, so erhält man gemittelt über mehrere Moleküle eine winkelabhängige Wahrscheinlichkeitsverteilung der Anregung (Hantel in Abb. 2-6), die bereits erwähnte Photoselektion. Dies bedeutet, für eine Anregung entlang der z-Achse sind die angeregten Moleküle symmetrisch um die z-Achse angeordnet und alle Moleküle mit einem Winkel  $\phi$  zwischen 0 und  $2\pi$  zur y-Achse besitzen die gleiche Wahrscheinlichkeit angeregt zu werden. So lässt sich die Abhängigkeit von  $\phi$  in Gleichung 2.25 durch Integration über den gesamten Winkelbereich von  $\phi$  aufheben (Gleichung 2.26).

$$\langle \sin^2 \phi \rangle = \frac{\int_0^{2\pi} \sin^2 \phi \, d\phi}{\int_0^{2\pi} d\phi} = \frac{1}{2} \quad (2.26)$$

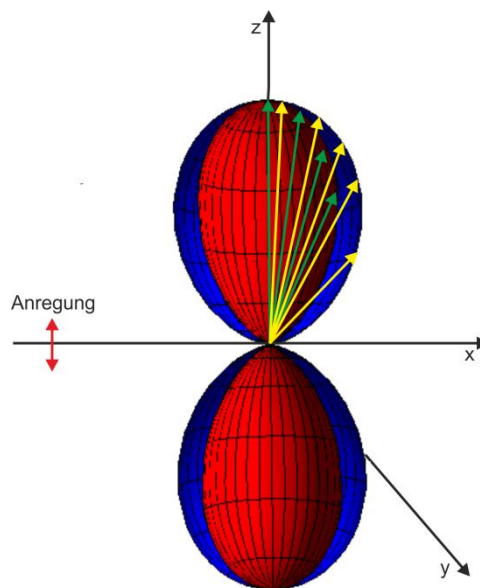
Danach vereinfacht sich Gleichung 2.25 zu Gleichung 2.27 und beide Intensitätskanäle lassen sich nun durch eine alleinige Abhängigkeit von dem Winkel  $\theta$  zur z-Achse beschreiben.

$$I_{\perp}(\theta) = \frac{1}{2} \sin^2 \theta \quad (2.27)$$

Werden die Gleichungen 2.24 und 2.27 in Gleichung 2.23 eingesetzt, so erhält man nach Vereinfachung durch die Beziehung  $\sin^2 \theta = 1 - \cos^2 \theta$  für die Anisotropie  $r$ , wobei  $n$  für die Anzahl der anregenden Photonen steht:

$$r = \frac{3\langle \cos^2 \theta \rangle - 1}{2} = \frac{2n}{2n+3} \quad (2.28)$$

Folglich ist die Anisotropie für Moleküle mit z-Achsensymmetrie vom Winkel  $\theta$  des Übergangsdipolmoments zur z-Achse abhängig ( $\cos^2 \theta$ ). Abbildung 2-8 zeigt die photoselektierte Verteilung der Übergangsmomente im angeregten Zustand für die EPA ( $\cos^2 \theta$ ) und die ZPA ( $\cos^4 \theta$ ).



**Abb. 2-8** Verteilung der Übergangsmomente im angeregten Zustand für EPA (blau) und ZPA (rot)

Betrachtet man wieder ein einzelnes Molekül mit parallelen Übergangsmomenten und  $\theta = 0^\circ$  zur z-Achse, so ergibt sich eine Anisotropie von 1. Solch ein Wert kann jedoch nur in Kristallen gemessen werden. In homogenen Lösungen ist es nicht möglich so eine perfekt ausgerichtete Bevölkerung im angeregten Zustand zu erhalten, so dass die Anisotropie in Lösungen immer deutlich kleiner ist. Bei einem Winkel von  $\theta = 54,7^\circ$  wird  $r$  gleich Null, die

Anisotropie geht komplett verloren. In einer Fluorophorlösung bedeutet dies allerdings nicht, dass alle Moleküle nach diesem Winkel ausgerichtet sind, sondern, dass der Durchschnitt gemittelt über die Ausrichtung aller Moleküle bei  $54,7^\circ$  liegt. Um die Anisotropie zu erhalten, muss der Mittelwert  $\langle \cos^2 \theta \rangle$  über den Winkelbereich von 0 bis  $\pi/2$  integriert werden.

Dieser ergibt sich mit Hilfe der Verteilungsfunktion  $f(\theta) = \cos^{2n} \theta \sin \theta d\theta$ , worin  $\cos^{2n}$  die Photos Selektion darstellt und  $\sin \theta d\theta$  die Anzahl der Moleküle im Kugelvolumenelement angibt:

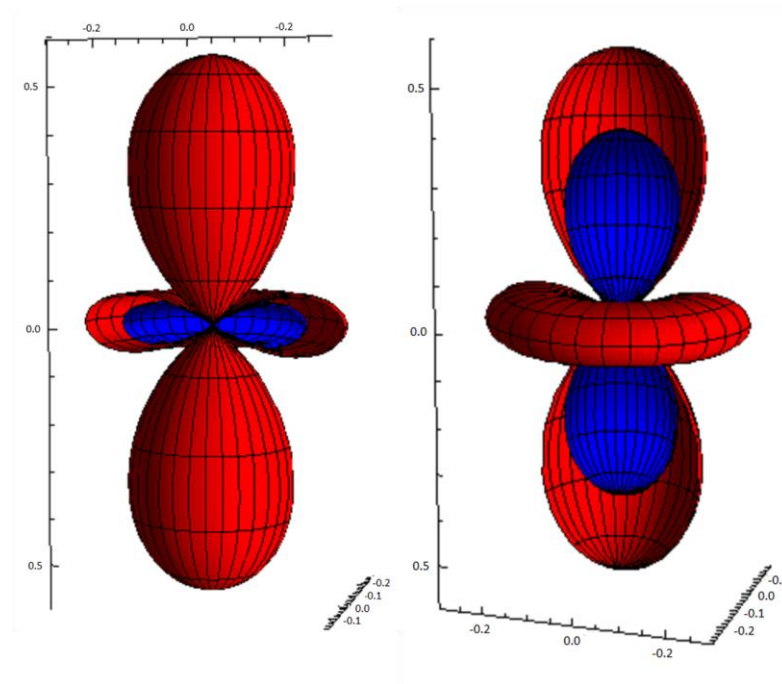
$$\langle \cos^2 \theta \rangle = \frac{\int_0^{\pi/2} \cos^2 \theta f(\theta) d\theta}{\int_0^{\pi/2} f(\theta) d\theta} \quad (2.29)$$

Für eine EPA ergibt sich der Mittelwert zu  $3/5$ . Setzt man diesen Wert in Gleichung 2.28 ein, so erhält man eine maximal erreichbare Anisotropie  $r$  von 0,4. Dieser Wert wird erreicht, wenn das durchschnittliche Anregungsdipolmoment der Moleküle in der statistisch verteilten Lösung parallel zum elektrischen Feldvektor des Anregungslichts steht. Für die ZPA ergibt sich der Mittelwert von  $\langle \cos^2 \theta \rangle$  zu  $5/7$  und für  $r$  somit ein maximaler Wert von 0,57. Diese Werte gelten für parallel zueinander stehende Absorptions- und Emissionsübergangsmomente. Da dies bei den meisten Fluorophoren nicht der Fall ist, wird die Anisotropie weiter reduziert und es ergibt sich die allgemeine Formel für die Anisotropie von zufällig angeordneten Molekülen in einer Lösung zu:

$$r = \frac{2n}{2n+3} \cdot \frac{3 \cdot \cos^2 \beta - 1}{2} \quad (2.30)$$

Darin wird der Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsdipolmoment durch  $\beta$  beschrieben. Für den Spezialfall  $\beta = 0$  geht Gleichung 2.30 in Gleichung 2.28 über.

Abbildung 2-9 zeigt die möglichen Werte für  $r$  nach Gleichung 2.30 für die EPA und ZPA in Abhängigkeit von  $\beta$  in einer 3D Polarkoordinatendarstellung.



**Abb. 2-9** Erreichbare Werte für  $r$  in Abhängigkeit von  $\beta$  für die EPA (blau) und ZPA (rot) in 3D Polarkoordinatendarstellung

Hierbei ist zu beachten, dass die Werte für  $\beta$  größer des magischen Winkels von  $54,7^\circ$ , negative Werte für  $r$  erzeugen. Tabelle 2.2 zeigt beispielhaft einige Werte ausgewählter Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment.

**Tab. 2.2** Exemplarische Werte für  $r$  in Abhängigkeit des Winkels  $\beta$  zwischen Anregungs- und Emissionsdipolmoment für EPA und ZPA

Winkel $\beta$	Anregung	Anisotropie $r$
$0^\circ$	EPA	0.4
	ZPA	0.57
$45^\circ$	EPA	0.1
	ZPA	0.14
$54,7^\circ$	EPA	0
	ZPA	0
$90^\circ$	EPA	-0.2
	ZPA	-0.29

Die Anisotropie ist also eine dimensionslose Größe, die Informationen über die durchschnittliche Winkeländerung eines Fluorophors zwischen Anregung und der darauf folgenden Emission von Photonen gibt.

Einige Prozesse können dazu führen, dass die Emission des Fluorophors während des angeregten Zustands depolarisiert wird und die Anisotropie sinkt. Dazu gehört die Rotationsdiffusion, ein Prozess, bei dem sich die Richtung der Übergangsmomente ändert. Wie ausgeprägt diese Rotationsdiffusion ist, hängt von der Viskosität des Lösungsmittels, wie auch von der Größe und Form des rotierenden Moleküls ab. Zeitaufgelöste Anisotropiemessungen eignen sich von daher gut, um die Umgebung eines Fluorophors, sowie dessen Gestalt und Größe durch die Bestimmung der Rotationsdiffusion, bzw. der Rotationskorrelationszeiten zu untersuchen.

Ein großes Anwendungsgebiet dieser Messmethode liegt z.B. in der Erforschung von Proteinbewegungen, sowie der Rotationsdynamik anderer, großer Biomoleküle. Nur während der Lebensdauer des angeregten Zustands und durch die Verwendung eines gepulsten Lasers können Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Anisotropie gemacht werden. Bei kleinen Fluorophoren in wenig viskosen Lösungsmitteln ist die Rotationsdiffusion beispielsweise sehr viel schneller als die Lebensdauer des angeregten Zustands, so dass die Anisotropie schnell sinkt. Der Einsatz von stark viskosen Lösungsmitteln würde die Rotationsdiffusion verlangsamen und die Rotationskorrelationszeit länger werden lassen.

Da die Messung der zeitaufgelösten Anisotropie von Nanopartikel-Dispersionen ein Hauptbestandteil dieser Arbeit ist, soll an dieser Stelle kurz auf die zeitaufgelöste Anisotropie eingegangen werden. Da unter anderem die Bestimmung der Rotationskorrelationszeiten sehr komplex ist, werden hier nur die für die Anwendung innerhalb dieser Arbeit wichtigen Elemente beschrieben. Für eine ausführliche Betrachtung sei auf Lakowicz verwiesen.<sup>[LAK2006]</sup> Der zeitaufgelöste Anisotropiezerfall eines Fluorophors ist, wie bereits zuvor erwähnt, abhängig von der Größe und Form des Moleküls, sowie seiner direkten Umgebung Allgemein ist er nach Gleichung 2.31 definiert:

$$r(t) = \sum_1^5 r_{oi} e^{-\frac{t}{\theta_i}} \quad \text{bzw.} \quad = r_0 \sum_1^5 g_i e^{-\frac{t}{\theta_i}} \quad (2.31)$$

Allgemein lässt sich der Anisotropiezerfall als eine Summe von mehreren Exponentialfunktionen beschreiben.<sup>[BEL1972]</sup> Dabei kann das  $r_0$  auf zweierlei Weise interpretiert werden. Handelt es sich dabei um eine bekannte Größe, die stationäre Anisotropie ohne Rotationsdiffusion, wie sie auf den voran gegangenen Seiten verwendet wurde, so kann sie vor die Summation gestellt werden. Handelt es sich um eine variable Größe, die aus mehreren Einzelkomponenten zusammen gesetzt sein kann, wird sie eher mit in die Summation einbezogen und beschreibt die Anisotropie zum Zeitpunkt  $t=0$ . Für schnelle Rotationskorrelationszeiten, die durch das Messsystem nicht aufgelöst werden können, ist  $r(0)$

kleiner als die fundamentale Anisotropie  $r_0$ . Beide Schreibweisen sind verbreitet. Das  $\theta$  steht für die Rotationskorrelationszeit und das  $g$  gibt die Anteile der einzelnen Rotationskorrelationszeiten an der Gesamtanisotropie an. Auf eine graphische Darstellung wird an dieser Stelle verzichtet, da diese sehr ähnlich ist zur Darstellung der Fluoreszenzabklingkurven in Abbildung 2.5.

Bei sphärischen Molekülen in einer homogenen Umgebung verläuft der Zerfall der Anisotropie monoexponentiell, bei asymmetrischen Molekülen sind aufgrund der unterschiedlichen Achsen im Molekül theoretisch bis zu 5 Rotationskorrelationszeiten möglich.<sup>[BAR1981]</sup> Allerdings sind diese sich zum Teil so ähnlich, dass im Experiment maximal 3 aufgelöst werden können.<sup>[SMA1977]</sup> Die verschiedenen Einzelanisotropien werden durch die Winkel der Absorptions- und Emissionsdipolmomente zu den Symmetrieachsen des Moleküls bestimmt.<sup>[BAR1981]</sup>

Bei nicht-sphärischen Molekülen wird nach den Diffusionsachsen in generelle Ellipsoide oder Rotationsellipsoide unterteilt. Erstere besitzen drei ungleiche Achsen und führen so zu drei unterschiedlichen Diffusionskoeffizienten  $D$ . Im Experiment ist es jedoch schwer diese Art von Ellipsoid fest zu stellen, da sich diese drei Koeffizienten meist nicht stark genug voneinander unterscheiden und somit nur zwei aufgelöst werden können. Die Rotationsellipsoide besitzen zwei gleiche und eine ungleiche Achse, man erhält also zwei unterschiedliche Diffusionskoeffizienten. Ist die ungleiche Achse länger als die beiden identischen, so wird von einem prolaten Rotationsellipsoiden gesprochen, wenn die ungleiche Achse die kürzere ist, handelt es sich um einen oblaten Ellipsoiden. Die ungleiche Achse ist immer als  $D_{\parallel}$  definiert, die gleichen Achsen als  $D_{\perp}$ .  $D_{\parallel}$  ist meist größer als  $D_{\perp}$ , da bei einer Rotation um die ungleiche Achse weniger Lösungsmittelmoleküle mit bewegt werden müssen. Nun kommt es noch darauf an, wo sich die Dipolmomente im Molekül befinden. Es kann sein, dass diese mit den Diffusions-bzw. Symmetrieachsen zusammen fallen, dann werden weniger Rotationskorrelationszeiten erhalten.

Die Arbeiten von Chuang und Eiseenthal (1972), sowie die von Lacowicz (2006) geben einen guten Überblick über die verschiedenen möglichen Anisotropiezerfälle.<sup>[CHU1972]</sup>,  
<sup>[LAK2006]</sup>

In dieser Arbeit kommen verschiedene Nitrobenzoxadiazolderivate vor, unter anderem das 6-(*N*-(7-nitrobenz-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-Hexansäure-Molekül (NBDAHA). Dieses wird von Greenough und Blanchard (2006) als prolater Elipsoid beschrieben.<sup>[GRE2006]</sup> Für diesen gib es zwei verschiedene Möglichkeiten für den Anisotropiezerfall. Liegen Absorptions- und Emissionsdipolmoment parallel zur langen Molekülachse, so wird nur eine

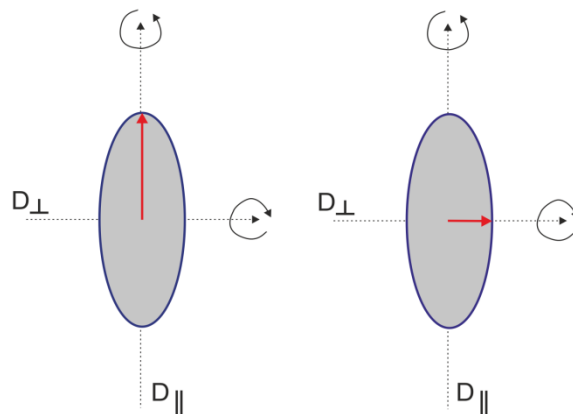
Rotationskorrelationszeit, bzw. nur  $D_{\perp}$  erhalten, da eine Drehung um  $D_{\parallel}$  die Lage des Emissionsdipolmoments nicht ändert. Dies bedeutet, dass die Emission bei einer Rotation um die lange Achse nicht depolarisiert wird und somit kein Einfluss auf die Anisotropie genommen wird. Der Anisotropiezerfall setzt sich dann wie folgt zusammen:

$$r(t) = 0.4e^{-6D_{\perp}t} = 0.4e^{-\frac{t}{\theta_1}} \quad (2.32)$$

Liegen die Dipolmomente senkrecht zur langen Achse, so werden zwei Rotationskorrelationszeiten beobachtet. Da in diesem Fall eine Rotation um die lange Achse zum Anisotropiezerfall beiträgt, ist dieser auch schneller als im oberen Fall, da die Rotation, wie bereits erklärt, um die lange Achse schneller ist. Gleichung 2.33 zeigt, wie sich der Anisotropiezerfall zusammen setzt:

$$r(t) = 0.3e^{-4D_{\parallel}t - 2D_{\perp}t} + 0.1e^{-6D_{\perp}t} = 0.3e^{-\frac{t}{\theta_2}} + 0.1e^{-\frac{t}{\theta_1}} \quad (2.33)$$

Abbildung 2-10 zeigt für beide genannten Varianten die Diffusionsachsen und Lagen der Übergangsdipolmomente in einem prolaten Ellipsoid.



**Abb. 2-10** Zweidimensionale Übersicht der Diffusionsachsen und Lagen der Übergangsdipolmomente (rot) in einem prolaten Ellipsoid. Einmal liegen die Übergangsdipolmomente parallel zur langen Molekülachse (links) und einmal senkrecht dazu (rechts)

Greenough und Blanchard (2006) haben in ihren Untersuchungen unter anderem in unterschiedlichen Alkoholen als Lösungsmittel nur eine Rotationskorrelationszeit festgestellt, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Übergangsmomente des NBDABA in diesem Fall parallel zur langen Molekülachse ausgerichtet sind.<sup>[GRE2006]</sup>

Hay et al. (2010) haben bei Untersuchungen zum Anisotropiezerfall von NBDABA und Resorfin festgestellt, dass das Lösungsmittel den Anisotropiezerfall beider Moleküle stark beeinflussen kann. In Wasser beschreiben Sie das Anisotropieverhalten beider Moleküle



ebenfalls als das eines prolaten Ellipsoiden nach Gleichung 2.32. In *n*-Octyl-2-pyrrolidon (NOP) hingegen ändert sich die rotierende Form in einen oblaten Rotor. Da beide Moleküle das gleiche Verhalten zeigen und sich im Falle des Resorfins die Dipolmomentsänderung in beiden Lösungsmitteln voneinander unterscheidet, während NBDAHA in beiden die gleiche Dipolmomentsänderung wiederfährt, bringen die Forscher dieses Verhalten mit einer Zunahme des hydrodynamischen Volumens des Lösungsmittels NOP in Zusammenhang.<sup>[HAY2010]</sup>

Der Anisotropiezerfall muss jedoch nicht nur von der Rotationsdiffusion abhängen. Bei Fluorophoren, die zum Beispiel an ein großes Biomolekül gebunden sind, kann es ebenfalls mehrere Rotationskorrelationszeiten geben. Die Ursache dafür liegt dann nicht allein in der Rotationsdiffusion, sondern zusätzlich in einer eingeschränkten Bewegungsmöglichkeit des Fluorophors, da dieser sich dann nur noch segmentweise bewegen kann. Man spricht dann von einem nicht-assozierten Anisotropiezerfall.<sup>[LAK2006], [LOU2007]</sup>

Da in dieser Arbeit Wechselwirkungen zwischen Stabilisatormolekülen an Nanopartikeloberflächen untersucht werden, ist dieser nicht-assozierte Anisotropiezerfall von Bedeutung und soll kurz erläutert werden. Durch die Verknüpfung des Fluorophors mit einem Großmolekül wird dessen Bewegung behindert und die Anisotropie sinkt nicht auf Null, sondern eine Restanisotropie ( $r_\infty$ ) bleibt bestehen. Der Anisotropiezerfall lässt sich dann nach Gleichung 2.34 beschreiben.<sup>[LAK2006]</sup> Hierbei können natürlich gegebenenfalls auch multisexponentielle Anisotropiezerfälle auftreten.

$$r(t) = (r_0 - r_\infty)e^{-\frac{t}{\theta}} + r_\infty \quad (2.34)$$

Zuletzt sei noch einmal auf die bereits erwähnte Abhängigkeit des Anisotropiezerfalls von der Viskosität des Lösungsmittels eingegangen. Diese Abhängigkeit lässt sich durch das Debeye-Stokes-Einstein Modell<sup>[SUH2005], [GRA2010]</sup> beschreiben (Gleichung 2.35).

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} \quad (2.35)$$

In einem sphärischen Molekül, welches sich in einem isotropen Medium befindet, ist demnach die Rotationskorrelationszeit  $\theta$  direkt proportional zur Viskosität des Mediums  $\eta$  und zum Volumen  $V$  der rotierenden Einheit. Durch den Nenner, in dem  $k$  die Boltzmannkonstante ist, wird auch deutlich, dass die Größe  $\theta$  ebenfalls von der Temperatur  $T$  beeinflusst werden kann. Sind die Viskosität des Lösungsmittels und das Volumen des rotierenden Moleküls bekannt, kann man mit diesem Modell die zu erwartende Rotationskorrelationszeit abschätzen.

Für nicht-sphärische Moleküle wurde Gleichung 2.35 um einen Korrekturfaktor  $f$ , dem sogenannten Formfaktor (*shape factor*) von Perrin <sup>[PER1934]</sup> erweitert.

$$\theta = \frac{\eta V}{kT} (f \cdot C) \quad (2.36)$$

Die Konstante  $C$  berücksichtigt außerdem die Wechselwirkung des rotierenden Moleküls mit dem umgebenden Lösungsmittel. Wenn das rotierende Molekül beispielsweise viel größer ist als die Lösungsmittelmoleküle, ist  $C=1$ . Bei vergleichbarer oder kleinerer Größe des gelösten Moleküls liegt  $C$  zwischen 0 und 1. <sup>[HU1974]</sup>

### **3 Experimentelle Realisierung und Techniken**

In diesem Kapitel wird eine Vielzahl wichtiger Informationen aus dem Bereich der experimentellen Umsetzung der Versuche innerhalb dieser Arbeit gegeben. Dabei wird zunächst das Messprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung beschrieben. Danach erfolgt die Erläuterung der in dieser Arbeit verwendeten Messaufbauten.

Einen weiteren Schwerpunkt nimmt der Bereich des Farbstofflabelings ein. Hier wird auf die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe, sowie die allgemeinen Reaktionen, die während des Labelings ablaufen, eingegangen. Die probenspezifischen Labelingprozeduren werden der Übersicht halber jedoch erst in den entsprechenden Kapiteln beschrieben.

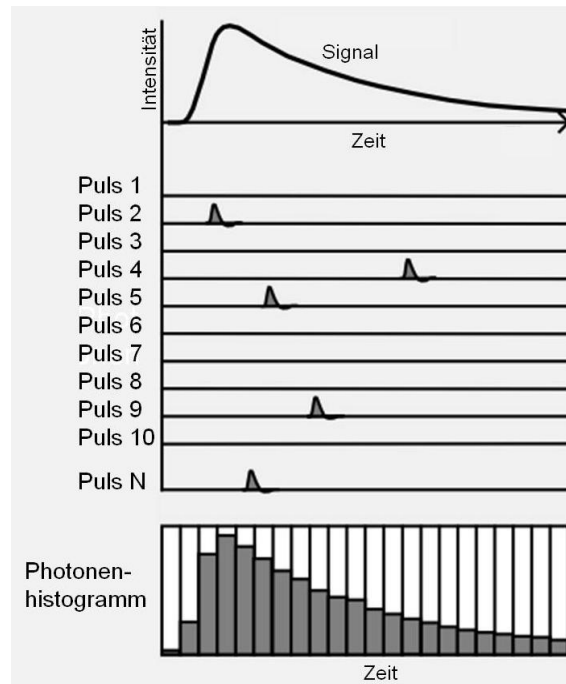
Einen extra Unterpunkt nimmt die Diskussion der bisherigen wissenschaftlichen Kenntnisse über das Verhalten des Farbstoffs 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) ein. Dies dient dazu eine Basis zu schaffen, um die Ergebnisse der eigenen Fluoreszenzuntersuchungen an den Nanopartikelsystemen in Kapitel 6 interpretieren und einordnen zu können.

Am Ende des Kapitels erfolgen Erklärungen aus dem Bereich der Datenanalyse.

#### **3.1 Time correlated single photon counting (TCSPC)**

Das Prinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC) wurde 1961 von Bollinger und Thomas bei Szintillationsexperimenten an Kristallen konzipiert <sup>[BOL1961]</sup> und ist seit dem eine der besten Methoden um Fluoreszenzlebensdauern zu bestimmen.

In Abbildung 3-1 ist das Messprinzip schematisch dargestellt. Es basiert auf der Detektion von einzelnen Photonen aus einer periodischen Lichtquelle und der Bestimmung der Detektionszeit. In Verbindung mit einem Piezoscanner als Probenhalter können so zeit- und orts aufgelöste Fluoreszenzaufnahmen generiert werden.



**Abb. 3-1** Klassisches Messprinzip der zeitkorrelierten Einzelphotonenzählung (TCSPC), nach: [BEC2004]

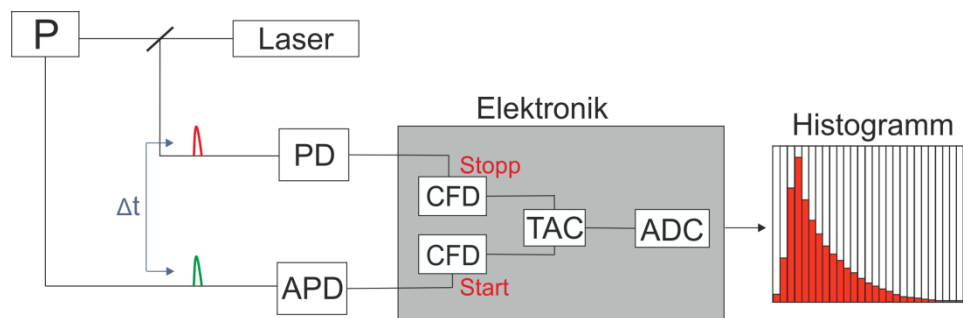
Das Detektorsignal besteht dabei aus Pulsen, die jeweils zu der Detektion eines Photons gehören. Mit Hilfe einer Photodiode wird der Laserpuls mit der TCSPC Einheit synchronisiert. Regt ein Photon des Laserpulses nun ein Fluorophor an, so emittiert dieser beim Rückfall in den Grundzustand ein Photon, welches zum Detektor gelangt und dort registriert wird. Dabei stellt der auf die Photodiode treffende Laserpuls ein Startsignal für die Zeitmessung da, während das Auftreffen des vom Fluorophor emittierten Photons auf den Detektor das Stoppsignal für die Zeitmessung ist. Diese Einzelereignisse werden mit ihrer Ankunftszeit am Detektor gespeichert und aus der Summe aller Einzelereignisse während der Messzeit wird dann das Photonenhistogramm erstellt. Dort ist die Anzahl der registrierten Photonen gegen die gemessene Zeit aufgetragen.

Heutzutage wird bei modernen Lichtquellen, wie dem Ti:Sa Laser nach dem umgekehrten Prinzip verfahren (*reverse mode*). Denn der Ti:Sa Laser besitzt mit 80 MHz eine zu hohe Wiederholrate für das klassische Prinzip. Würde jeder Laserpuls die interne Stoppuhr des TCSPC Systems starten, könnten die emittierten Fluoreszenzphotonen auf dem Detektor nicht mehr registriert werden, da vor deren Ankunft bereits schon weitere Laserpulse die Stoppuhr neu synchronisiert haben. Außerdem besitzen die Detektoren und auch die Elektronik, die die Signale registriert, verstärkt und verarbeitet sogenannte Totzeiten, die auch dazu beitragen das nur eine bestimmte Anzahl Ereignisse registriert werden können. Bei den

Detektoren spricht man von einer Halbwertsbreite (FWHM) für die Signalumwandlung, und bei Signalweiterleitung durch die Elektronik von Jitter, welcher im Bereich von 10 ps liegt.

Beim umgekehrten System startet das emittierte Photon bei der Ankunft am Detektor das Startsignal. Der nächste an der Photodiode auftreffende Laserpuls beendet hingegen die Zeitmessung für dieses Photon. Dadurch müssen viel weniger Ereignisse registriert und verarbeitet werden, da die Häufigkeit für das Auftreten eines Photons am Detektor deutlich geringer ist als die Laserpulse die von der Lichtquelle ausgesendet werden.

In Abbildung 3-2 ist eine passende Schaltskizze eines TCSPC Systems mit elektronischer Signalverarbeitung im *reverse mode* dargestellt.



**Abb. 3-2** Elektronische Schaltskizze des TCSPC-Systems im *reverse mode*, die Erklärung erfolgt im Text

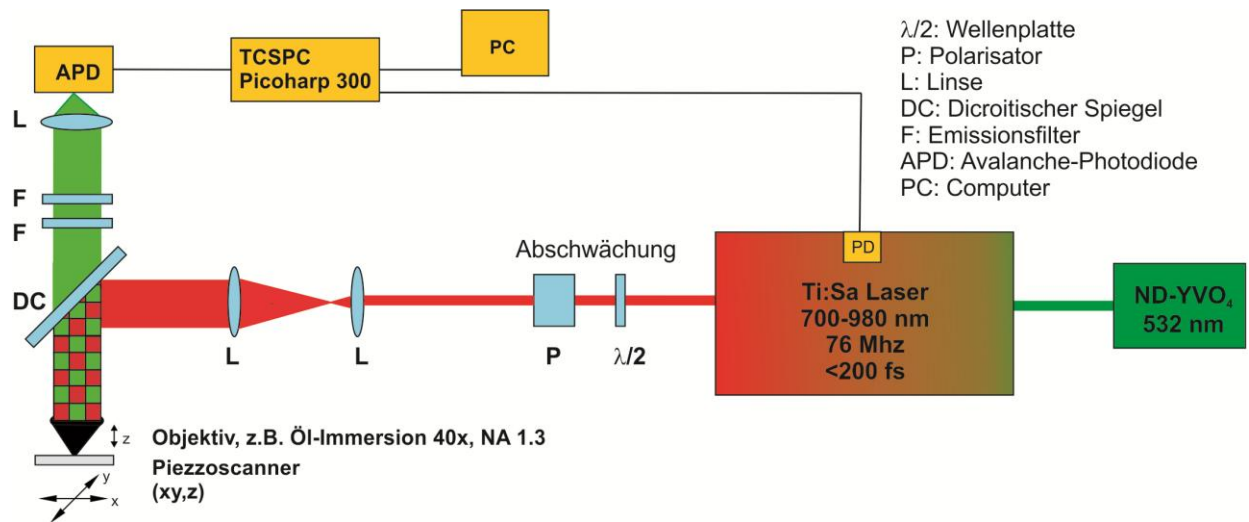
Dabei wird das System durch ein elektrisches Signal der Photodiode (PD) mit dem Laser synchronisiert. Das auf den Detektor (APD) auftreffende, von der Probe (P) emittierte Photon startet (Start) die Zeitmessung. Am *constant function discriminator* (CFD) wird die genaue Auftreffzeit ermittelt. Im anschließenden *time-to-amplitude converter* (TAC) wird eine zum zeitlichen Verlauf proportionale Spannungsrampe gefahren. Währenddessen dient ein zweiter CFD dazu, das Auftreffen des ersten Laserpulses nach der Emission des Photons zu registrieren. Durch dieses Stoppsignal (Stopp) wird der TAC beendet. Er besitzt eine Spannung, die proportional zu der Zeit zwischen der Photonenemission und dem Laserpuls ist. Daraus lässt sich mit Hilfe des Analog-Digital-Umsetzers (ADC) das Photonenhistogramm erstellen.

Die Beschreibung des TCSPC-Systems orientiert sich an Lakowitz (2006) und Becker (2004). Für eine genauere Betrachtung wird auf die beiden Arbeiten verwiesen.<sup>[LAK2006 ], [BEC2004]</sup>

### 3.2 Imaging

In diesem Unterkapitel wird der Mikroskopaufbau für das dreidimensionale Imaging der Fluoreszenzintensität beschrieben, welches innerhalb dieser Arbeit für die Untersuchung der

Aminogruppenverteilung auf Oberflächen angewendet wurde.



**Abb. 3-3** Aufbau zum Imaging am TCSPC Mikroskop

Für die Anregung der Fluoreszenz wurde ein Titan-Saphir Laser (Ti:Sa, Mira 900D) der Firma Coherent verwendet. Dieser wurde durch einen diodenbetriebenen Feststofflaser, dem Neodym-Yttriumorthovanadat Laser (YAG, Verdi 10 W, Coherent), gepumpt. Durch Frequenzverdopplung wird eine Wellenlänge von 532 nm erreicht.

Mit dieser Wellenlänge lässt sich der Titan-Saphir Laser gut pumpen, da der Absorptionsbereich des mit Titanionen dotierten Korundkristalls zwischen 370 und 670 nm liegt, mit einem Maximum bei ca. 500 nm.

Der Titan-Saphir Laser weist eine Wiederholrate von 76 MHz auf und ist durch eine passive Modenkopplung in der Lage ultra kurze Pulse von ca. 200 Femtosekunden zu erzielen, wodurch die Zweiphotonenanregung möglich wird (siehe Kapitel 2.2).

Der Kristall des Titan-Saphir Lasers besitzt eine sehr breite Fluoreszenzbande, sodass der Laser in einem Wellenlängenbereich von 700-980 nm durchstimmbare ist. Die maximale Leistung erzielt er bei ca. 800 nm, diese kann etwa bis zu 1,8 Watt betragen.

Direkt hinter dem Laser kann der ausgekoppelte IR-Strahl durch die Kombination eines Polarisators (Lambda-Halbe, B. Halle Nachfolger GmbH) mit einer Verzögerungsplatte um  $\lambda/2$  (B. Halle Nachfolger GmbH) in seiner Leistung frei eingestellt werden, so dass z.B. biologische Proben durch eine zu hohe Leistung nicht zerstört werden. Bevor der Laserstrahl in das Mikroskop eingekoppelt wird, wurde dieser durch ein Linsensystem aufgeweitet, um so das Mikroskop und die Rückapertur des Objektivs vollständig auszuleuchten und so eine möglichst hohe Auflösung zu erreichen.

Ein dichroitischer Spiegel reflektiert den Laserstrahl in Richtung Objektiv (Zeiss EC Plan-Neofluar 40x, NA 1.30, Ölimmersion). Dieses fokussiert die Strahlung in die Probe hinein. Die ausgesendete Fluoreszenz nimmt den gleichen Weg wie das Anregungslicht, weshalb es sich um ein konfokales Fluoreszenzmikroskop handelt.

Das Objektiv sammelt das Fluoreszenzlicht ein, welches dann durch den dichroitischen Spiegel in den Detektionsweg transmittieren kann. Dort erfolgt zunächst eine spektrale Aufreinigung des Fluoreszenzlichts durch einen BG-39 Filter, sowie einen Interferenzfilter FF01-530/40 (Semrock, BrightLine). Anschließend erfolgt die Detektion der Fluoreszenzphotonen mit Hilfe einer Avalanche-Photodiode, die mit dem in Abschnitt 3.1 beschriebenen TCSPC-System verbunden ist.

Mit der Software SymPhoTime (V5.2.3.2, Pico Quant GmbH) können die Fluoreszenzbilder am Computer angesehen werden und dann als Textdatei mit den orts aufgelösten, aufsummierten Intensitätsdaten exportiert und in einem Grafikprogramm, wie z.B. ImageJ von den National Institutes of Health, bearbeitet werden.

Um dreidimensionale Aufnahmen generieren zu können, befindet sich die Probe auf einem scan-fähigen Probentisch der Firma PI Physik Instrumente (P-733.2CL). So ist es möglich die Probe während einer Messung in x- und y-Richtung zu bewegen und eine Flächenmessung durchzuführen. Mithilfe eines weiteren Scanners (P-721.CLQ, PI Physik Instrumente), kann das Objektiv in der Höhe verstellt werden, wodurch sich die z-Position in der Probe ändern lässt. Dadurch lassen sich mehrere aufeinander folgende Aufnahmen in unterschiedlichen Höhen machen, die später zu einem dreidimensionalen Bild gestapelt werden können. Dies erfolgte in dem Programm ImageJ mit Hilfe des 3D Plugins „Volume Viewer“.

### 3.3 Anisotropie

In diesem Unterkapitel wird der Aufbau des Fluoreszenzmikroskops für die Anisotropiemessungen der Nanopartikeldispersionen beschrieben. Des weiteren wird auf die Datenaufnahme und Analyse eingegangen.

Abbildung 3-4 zeigt eine schematische Skizze des Aufbaus.

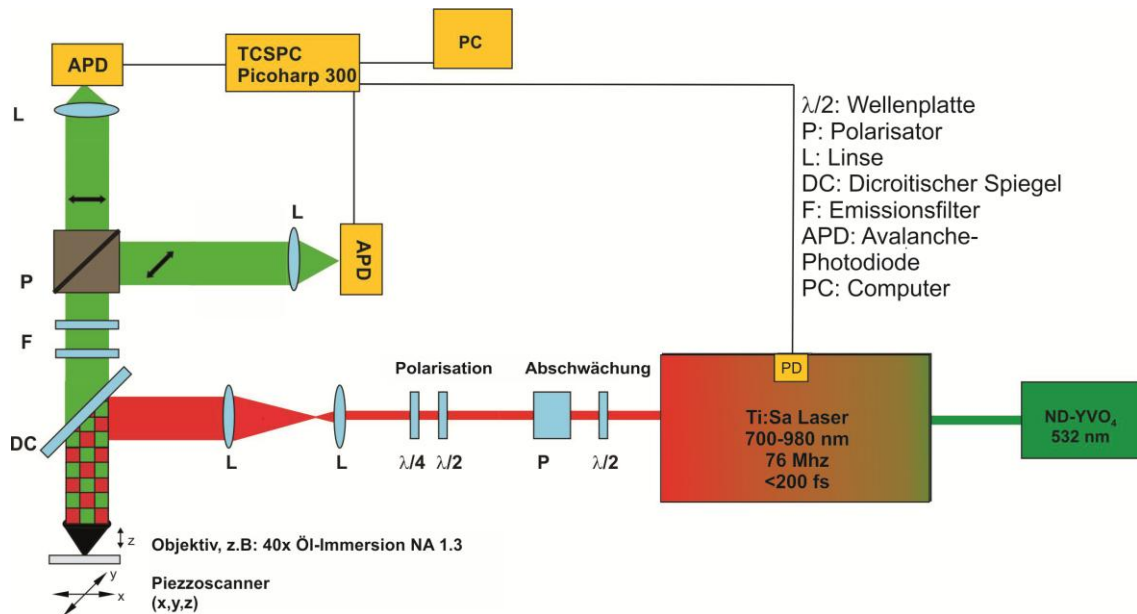


Abb. 3-4 Aufbau für die Anisotropiemessungen am TCSPC Mikroskop

Dieser entspricht in den Grundzügen dem Aufbau für das Imaging, der im vorherigen Unterkapitel erklärt wurde. Daher soll hier nur noch auf die Unterschiede eingegangen werden, die vor allem im Detektionsweg entstehen. Aber auch im Anregungsweg sind zwei weitere Bauteile, die Verzögerungsplatten ( $\lambda/2$  und  $\lambda/4$ , B. Halle Nachfolger GmbH) eingebaut, die es ermöglichen, die Polarisation des Anregungsstrahls zwischen linearer und zirkulärer Polarisation zu variieren.

Da für die Anisotropiemessungen der Nanopartikel nur vertikal bzw. horizontal linear polarisiertes Laserlicht erforderlich ist, wurde die Verzögerungsplatte um  $\lambda/4$  nicht benötigt und kann aus dem Strahlengang genommen werden. Um von horizontal polarisiertem Licht zu vertikal polarisiertem Licht zu gelangen, muss die Polarisationssebene des Lichts um  $90^\circ$  gedreht werden, die  $\lambda/2$  Platte also um  $45^\circ$  verstellt werden.

Im Detektionsweg erfolgt zunächst eine spektrale Aufreinigung des Fluoreszenzlichts durch einen BG-39 Filter, sowie einen Interferenzfilter FF01-530/40 (Semrock, BrightLine). Danach folgt ein Dünnschichtpolarisator in Form eines Würfels, der das Fluoreszenzlicht in einen parallelen und senkrechten Kanal aufteilt.

Beide Intensitätskanäle werden dann von jeweils einer Avalanche-Photodiode (APD, MPD) detektiert. Dies ermöglicht eine zeitgleiche Messung beider Kanäle nach dem T-Format und verringert so den Messaufwand. Da nur zwei Messungen (einmal mit linear und einmal mit horizontal polarisiertem Anregungslicht) durchgeführt werden müssen, um alle für die Bestimmung der Anisotropie erforderlichen Intensitätskanäle zu erhalten.



Die weitere Signalverarbeitung erfolgt über das in Abschnitt 3.1 beschriebene TCSPC-System, sowie die Software SymPhoTime (V5.2.3.2, Pico Quant GmbH). Die erhaltenen Daten für die Fluoreszenzintensitäten wurden dann als Textdatei exportiert und können anschließend ausgewertet werden.

Da nicht davon ausgegangen werden kann, dass die Effizienz beider Detektoren identisch ist, ist es notwendig in Gleichung 2.23 einen Korrekturfaktor einzuführen, der die gerätespezifische Detektionseffizienz erfasst. Dies ist der sogenannte „G-Faktor“, der sich nach Gleichung 3.1 berechnen lässt <sup>[SIE2003]</sup>:

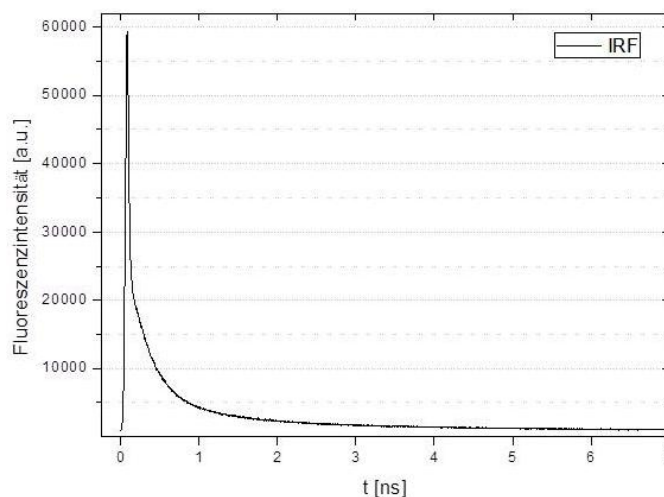
$$G = \sqrt{\frac{I_{vv} \cdot I_{hv}}{I_{vh} \cdot I_{hh}}} . \quad (3.1)$$

Dabei beschreibt der erste Buchstabe des Subskripts die Polarisation der Anregung und der zweite die Polarisation der Fluoreszenz. Für den Intensitätskanal  $I_{vv}$  bedeutet dies also, dass mit vertikaler Polarisation angeregt wurde und die Fluoreszenz aus dem Detektionsweg für die ebenfalls vertikale Polarisation stammt. Vertikal und horizontal beziehen sich dabei auf den Labortisch als Bezugsquelle.

Um nun auf die in Kapitel 2.4 gängigen Bezeichnungen  $I_{\parallel}$  bzw.  $I_{\perp}$  zu kommen werden einfach zwei gleiche Buchstaben ( $hh$ ,  $vv$ ) miteinander kombiniert, oder aber zwei unterschiedliche für den senkrechten Fall ( $hv$ ,  $vh$ ). So ergibt sich für den Anisotropiezerfall unter Berücksichtigung der Gerätefaktoren Gleichung 3.2.

$$r = \frac{I_{\parallel} - G \cdot I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2G \cdot I_{\perp}} \quad (3.2)$$

Die aus den Messungen erhaltenen Daten wurden in einem in der Arbeitsgruppe selbstgeschriebenen Programm in Matlab (The MathWorks) nach Gleichung 3.2 ausgewertet und das  $r(t)$  dann exponentiell gefittet. Hierbei ist es wichtig, die Antwortfunktion seines Detektionssystems (IRF) zu kennen, um so die Auflösung zu verbessern. Abbildung 3-5 zeigt die in Mineralöl gemessene IRF des Messsystems.



**Abb. 3-5** IRF des Messsystems für die Anisotropiemessung der Nanopartikel bei 850 nm, Zeitauflösung 4 ps, FWHM = 60ps

Die Breite des Signals auf halber Höhe (FWHM) beträgt hier 60 ps. Das heißt Fluoreszenzlebensdauern oder Rotationskorrelationszeiten, die innerhalb dieses zeitlichen Bereichs liegen, oder gar kleiner sind, können durch das Messsystem nicht mehr sicher aufgelöst werden. Deshalb ist es ratsam bei sehr kurzen Fluoreszenzlebensdauern oder Rotationskorrelationszeiten die gemessene Fluoreszenzintensität durch eine Faltung mit der IRF zu korrigieren.

Da die zu bestimmenden Größen in dieser Arbeit aber in den meisten Fällen deutlich länger sind als die IRF, wurde bei der Datenauswertung auf eine Faltung der Messsignale mit der IRF verzichtet. Stattdessen wurden die exponentiellen Fitfunktionen mit Hilfe der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (*least squares*) direkt an die gemessenen Signale angepasst. Dazu wurde der Algorithmus von Levenberg-Marquardt angewendet.<sup>[MAR1963]</sup>

Die in Kapitel 6.3 angegebenen Ergebnisse stammen aus einer gewichteten Mittelwertbildung der bestimmten Fluoreszenzlebensdauern bzw. Rotationskorrelationszeiten. Als Fehler wurden nicht die Fehler aus den Fits angegeben, sondern die statistischen Abweichungen vom Mittelwert, da diese größer sind als die Fehler, die aus den Fits resultieren.

### 3.4 Farbstofflabeling

Um Moleküle bzw. funktionelle Gruppen, die von sich aus keine Fluoreszenz (Autofluoreszenz) zeigen, anregen und dessen Fluoreszenzverhalten untersuchen zu können, ist es erforderlich, diese mit sogenannten Fluoreszenzfarbstoffen zu markieren. Man spricht von Fluoreszenzlabeling.

Bei der Auswahl des richtigen Farbstoffs für Probe und Fragestellung der Untersuchung muss der Farbstoff einige Anforderungen erfüllen. Es ist wichtig, dass dieser seine Zweiphotonenanregung im Wellenlängenbereich des verwendeten Ti:Sa Lasers besitzt (700-980 nm) und dort mit einer großen Quantenausbeute angeregt werden kann. Auch der Zweiphotonenanregungsquerschnitt soll möglichst hoch sein. Wichtig ist ebenfalls, dass der Farbstoff photostabil ist und sich bei der Anregung nicht zersetzt.

Geht es darum die Eindringtiefe eines Moleküls in ein Substrat zu ermitteln, ist die Größe des Farbstoffs, der zusätzlich an das Molekül gebunden werden muss, ebenfalls entscheidend. Weist das Substrat nur kleine Poren auf, durch die das Molekül samt Farbstoff hindurch diffundieren kann, sollte Wert darauf gelegt werden, dass der Farbstoff möglichst klein ist.

Von Vorteil ist außerdem der Einsatz von fluorogenen Farbstoffen, da diese erst unter bestimmten Bedingungen Fluoreszenz zeigen. So gibt es Farbstoffe die nur dann fluoreszieren, wenn sie an eine bestimmte funktionelle Gruppe, wie z.B. eine Aminogruppe gebunden sind.

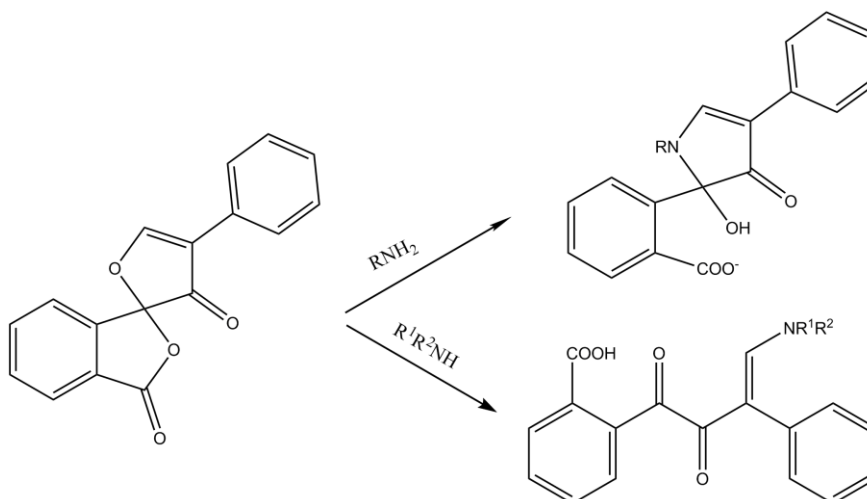
Im folgenden Abschnitt werden die Eigenschaften der verwendeten Farbstoffe beschrieben.

### **3.4.1 Eigenschaften der angewendeten Farbstoffe**

#### Fluorescamin

Das Fluorescamin (4-Phenylspiro-[furan-2(3H),1-phthalan]-3,3'-dion) oder auch Fluram® genannt, reagiert mit primären Aminogruppen zu einem fluoreszierenden Addukt.<sup>[FEL1975]</sup>

Dieses lässt sich bei 390 nm mit einer EPA anregen und sendet Fluoreszenz im Bereich von 475 nm aus.<sup>[IMA1984]</sup> Fluorescamin reagiert ebenfalls mit sekundären Aminogruppen, jedoch ergeben sich daraus nicht-fluoreszierende Addukte. In Abbildung 3-6 werden beide Reaktionen gezeigt.



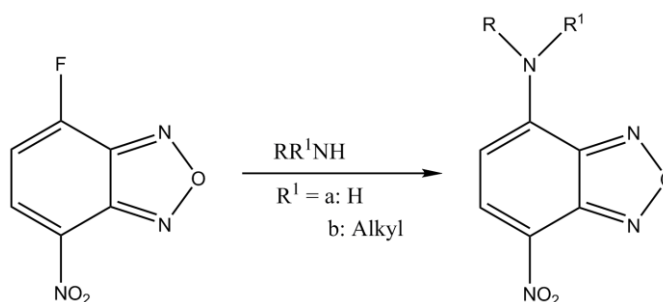
**Abb. 3-6** Reaktion von Fluorescamin mit primären und sekundären Aminen

Die Reaktion läuft bei Raumtemperatur in nur wenigen Sekunden (1-5 Sekunden) ab.<sup>[UDE1972]</sup>

Die Quantenausbeute  $\phi$  weist für Lösungen aus verschiedenen Aminen in Ethanol eine Spanne von 0,09 für Glycinmethylester bis 0,34 für Leucylamin auf. Das Addukt aus Fluorescamin und Butylamin besitzt eine Quantenausbeute von 0,23.<sup>[BER1974]</sup> Unter Quantenausbeute wird allgemein das Verhältnis zwischen der Anzahl aller absorbierten Photonen zu der Anzahl der tatsächlich zur Fluoreszenz führenden Photonen bezeichnet. Die Fluoreszenzlebensdauer  $\tau$  für das Addukt mit Butylamin liegt in Wasser bei 1,7 ns und steigt in Acetonitril auf 11,7 ns. In Ethanol wird eine Fluoreszenzlebensdauer von 7,5 ns erreicht.<sup>[BER1974]</sup> Es ist zu beachten, dass Fluorescamin stark hydrolyseempfindlich ist, wobei das Hydrolyseprodukt keine Fluoreszenz zeigt.<sup>[UDE1972], [STE1974]</sup> Das Ausmaß der Hydrolyse kann durch den pH Wert der Reaktionslösung gesteuert werden. So liegt das Fluoreszenzmaximum bei einem pH Wert von 8-9,5. Wenn der pH Wert zu niedrig ist, wird das Amin protoniert und die Reaktion zwischen Amin und Fluorescamin kann nicht stattfinden. Bei einem zu hohen pH Wert dominiert die Hydrolysereaktion gegenüber der fluorogenen Reaktion.<sup>[BER1974]</sup>

### NBD-F

Der Farbstoff NBD-F (4-Fluor-7-nitrobenzofurazan) gehört zur Klasse der Benzofurazane. Dieser reagiert mit primären und sekundären Aminogruppen zu fluoreszierenden Addukten. In Abbildung 3-7 ist die allgemeine Reaktion von NBD-F mit primären und sekundären Aminen dargestellt.



**Abb. 3-7** Reaktion von NBD-F mit einem primären (a) oder sekundären Amin (b)

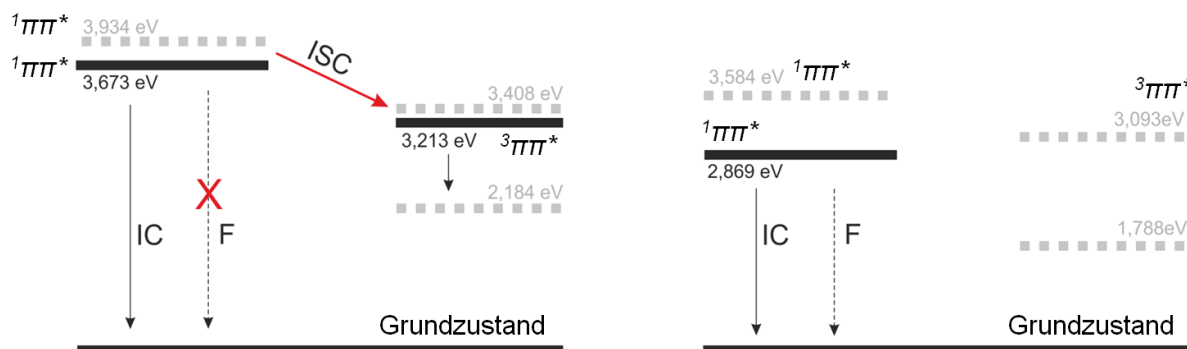
Das NBD-F hat das Chloranalogon NBD-Cl mittlerweile weitestgehend ersetzt, da es um das 50 bis 100-fache reaktiver mit Aminen zu einem fluorogenen Produkt umgesetzt werden kann.<sup>[TOY1983]</sup> Halogenbenzoxymurazane reagieren zwar auch mit phenolischen Hydroxygruppen, deren Addukte zeigen jedoch keine Fluoreszenz. Bei niedrigen pH Werten (3-5) kann ebenfalls eine Reaktion mit Thiolen stattfinden. Allerdings macht die Fluoreszenzintensität der NBD-Thiole nur etwa zwei Prozent derer, der NBD-Amine aus.<sup>[GHO1968]</sup> In wässriger Lösung hydrolysiert das NBD-F leicht an der Fluorfunktion. Es bildet sich das NBD-OH (4-Hydroxy-7-nitrobenzo-oxa-1,3-diazol).<sup>[IMA1984]</sup> Da dieses auch leicht fluoresziert sollte in trockenen Lösungsmitteln gearbeitet werden.

Das Absorptionsspektrum der NBD-Aminoaddukte weist drei charakteristische Banden auf.<sup>[HEB1986]</sup> Dabei wird die Bande bei 255 nm dem aromatischen System zugeordnet. Die zweite Bande hat ihr Maximum zwischen 306 und 360 nm. Die genaue Lage ist abhängig von der Art des Amins, sowie vom Lösungsmittel und zeigt einen  $\pi\pi^*$  Übergang an. Die dritte Bande ist sehr intensiv und liegt in einem Bereich von 420 bis 470 nm.<sup>[FER1993],[IMA1984]</sup> Diese wurde als Charge-Transfer Bande charakterisiert, in der die Aminogruppe als Elektronendonator und die Nitrogruppe als Elektronenakzeptor fungiert.<sup>[NAG1963]</sup> Auch diese Bande wird von der Umgebung beeinflusst. Beide Banden ( $\pi\pi^*$  und Charge Transfer) werden durch eine Zunahme der Polarität des Lösungsmittels rotverschoben. Die Auswirkungen des organischen Rests an der Aminogruppe, wie auch die der Viskosität und Polarität des Lösungsmittels auf die photophysikalischen Eigenschaften und das Dipolmoment der NBD-Gruppe, werden in Kapitel 3.4.2 anhand ausgewählter Ergebnisse von Untersuchungen anderer Wissenschaftler vertieft. Dabei wurde ein großes Augenmerk auf die Vergleichbarkeit der Anwendungsgebiete der anderen Arbeitsgruppen zu denen in dieser Arbeit gelegt. Was sich als schwierig gestaltete, da gerade in der Nanopartikelforschung noch keine Untersuchungen vorliegen, die auf ähnliche Weise durchgeführt wurden.

### 3.4.2 Kenntnisstand NBD-F

Bevor in diesem Kapitel Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen beschrieben werden, die für die Interpretation der Messungen an den Nanopartikelsystemen in dieser Arbeit interessant sind, wird zunächst erklärt, warum die NBD-Gruppe sich so gut eignet, um damit Aminogruppenfunktionen auf Basis von Fluoreszenzmessungen zu untersuchen.

Wie in Abschnitt 3.4.1 beschrieben, zeigt das Ausgangsprodukt NBD-F (4-Fluor-7-nitrobenzofurazan) von sich aus keine Fluoreszenz, sondern erst nach Reaktion mit einem primären oder sekundären Amin. Gerade dieses Verhalten macht den Farbstoff so wertvoll für die Untersuchung des Fluoreszenzverhaltens von Aminen, da wirklich nur ein Fluoreszenzsignal hervorgerufen wird, wenn die NBD-Gruppe an eine Aminofunktion gebunden ist. Ursache dafür ist ein Mechanismus der je nach Art des Substituenten an der 4er Position des Benzofurazans die Fluoreszenz an oder abschalten kann. Dabei spielen die Prozesse, die den angeregten Zustand entvölkern eine wichtige Rolle. Beim 4-Fluor-7-nitrobenzofurazan wird dieser durch strahlungslosen Zerfall, wie auch durch ein Intersystem-Crossing entleert. Substituiert man nun die Fluorfunktion durch eine Aminofunktion, so tritt neben dem strahlungslosen Zerfall Fluoreszenz auf, da die Aminogruppe das Intersystem-Crossing verhindert. In Abbildung 3-10 sind die Energiediagramme der Zustände für beide Moleküle nach Uchiyama et al. (2003) dargestellt. Diese ergeben sich aus theoretischen Molekülorbitalberechnungen.<sup>[UCH2003]</sup>



**Abb. 3-8** Energiediagramme zur Beschreibung des Relaxationsverhaltens von NBD-F (links) und NBD-Methylamin (rechts) als NBD-Derivat mit einer primären Aminogruppe (nach: [UCH2003])

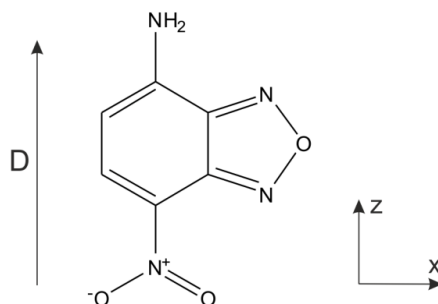
Nun folgt eine Beschreibung des sehr sensitiven Verhaltens der NBD-Gruppe gegenüber seiner molekularen Umgebung, welches sich zum Teil stark auf das Fluoreszenz- und Rotationsverhalten auswirkt. Nacheinander wird nun auf das Dipolmoment der NBD-Gruppe eingegangen, sowie auf den Einfluss der Polarität und Viskosität der Lösungsmittel und umgebenen Substrate auf das Fluoreszenzverhalten. Der Einfluss der Fähigkeit des

Lösungsmittels, Wasserstoffbrücken zur fluorophoren Gruppe auszubilden wird ebenfalls diskutiert.

### Dipolmoment

Wie bereits in Kapitel 3.4.1 erwähnt, kommt es bei der Anregung der NBD-Gruppe in polaren Lösungsmitteln zu einer Rotverschiebung. Damit es dazu kommt, muss sich zwischen dem Grund- und ersten angeregten Zustand die Wechselwirkung zwischen Fluorophor und Lösungsmittel ändern. Dies wird durch eine Änderung des Dipolmoments und eine Umorientierung der Solvenzmoleküle um den Fluorophor herbeigeführt. Voraussetzung dafür ist, dass der Fluorophor polar ist und ein permanentes Dipolmoment aufweist. Ändert sich dieses dann während der Anregung, richten sich die Dipolmomente der Lösungsmittelmoleküle bei der Anregung neu aus, um wieder in einer energetisch bevorzugten Umgebung zu sein.

Der NBD-Fluorophor ist durch die elektronenziehende Nitrogruppe und die elektronenliefernde Aminogruppe am aromatischen Ring sehr polar und besitzt daher ein Dipolmoment. Fery-Forgues et al. (1993) <sup>[FER1993]</sup> haben exemplarisch die Dipolmomente von Benzofurazan- und 7-Nitrobenzofurazan-Derivaten mit unterschiedlichen Aminogruppen-substituenten in der 4-Position durch MNDO (Modified Neglect of Differential Overlap) Berechnungen miteinander verglichen. Dabei stellten sie fest, dass das Dipolmoment hauptsächlich entlang der z-Achse des Moleküls orientiert ist (siehe Abb. 3-9).

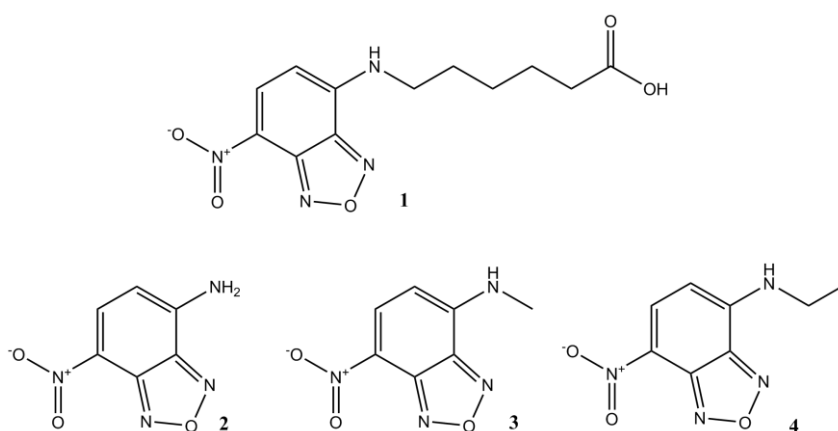


**Abb. 3-9** Lage des Dipolmoments (D) im Fluorophor 4-Amino-7-Nitrobenzofurazan

Das Vorhandensein der Nitrogruppe in Position 7 lässt das Dipolmoment im Grundzustand beim Benzofurazan von 4,00 auf 6,30 D steigen. Bei dem Aminoderivat 4-Aminobenzofurazan von 3,49 auf 6,45 D, sodass deutlich wird, dass die Nitrogruppe am aromatischen Ring das Dipolmoment im Grundzustand erhöht, in dem diese die Elektronen des aromatischen Systems zu sich zieht. Vom Grund- zum ersten angeregten Zustand erhöht sich das Dipolmoment für 4-Aminobenzofurazan um 1,62 D. Mori und Kaino (1988) haben für das Molekül 7-Nitro-4-Aminobenzofurazan eine Erhöhung des Dipolmoments um 5,9 D

entlang der z-Achse des Moleküls berechnet und eine Erhöhung um 0,3 D entlang der x-Achse.<sup>[MOR1988]</sup> Auch hier ist die Gegenwart der Nitrogruppe am aromatischen Ring für den Anstieg des Dipolmoments im angeregten Zustand verantwortlich.

Mukherjee et al. (1994)<sup>[MUK1994]</sup> haben die Änderung des Dipolmoments von 6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-Hexansäure (NBDAHA) während der Anregung experimentell, wie auch durch semiempirische Quantenberechnungen ermittelt und mit weiteren berechneten Dipolmomenten für NBD-Derivate mit unterschiedlicher Kettenlänge verglichen. Dabei passte der experimentell ermittelte Wert von 3,9 D für NBDAHA gut zu dem berechneten Bereich von 3,5-3,6 D.<sup>[MUK1994]</sup> Die Strukturen der verwendeten Moleküle sind in Abb. 3-10 zu sehen.



**Abb. 3-10** Struktur von NBDAHA (1) und den weiteren verwendeten NBD-Derivaten für die Berechnung der Dipolmomentsänderung

Dabei liegen die Dipolmomentsänderungen für die verschiedenen NBD-Derivate zwischen 3,5 und 3,6 D. Von der reinen Aminogruppe (2) als Substituenten zur methylierten Aminogruppe (3) ändert sich die Dipolmomentsänderung nur leicht und von Derivat (3) zu Derivat (4), welches nur eine weitere CH<sub>2</sub>-Gruppe enthält, bleibt die Dipolmomentsänderung gleich. Die Methylgruppe übt also einen leichten induktiven Effekt aus, sodass die Ladungstrennung zwischen dem Stickstoff der Aminogruppe und den Sauerstoffatomen der Nitrogruppe größer wird. Eine weitere Kettenverlängerung hinter der Aminogruppe besitzt jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Dipolmomentsänderung, sodass auch die Carboxylgruppe der Säurefunktion im NBDAHA Molekül keinen Einfluss mehr hat, weil sie zu weit vom aromatischen System entfernt ist.<sup>[MUK1994]</sup>

### Polarität und Viskosität

Fery-Forgues et al. (1993) haben die photophysikalischen Eigenschaften zweier NBD-Derivate in 18 verschiedenen Lösungsmitteln untersucht. Als Modellkomponenten wurden *n*-

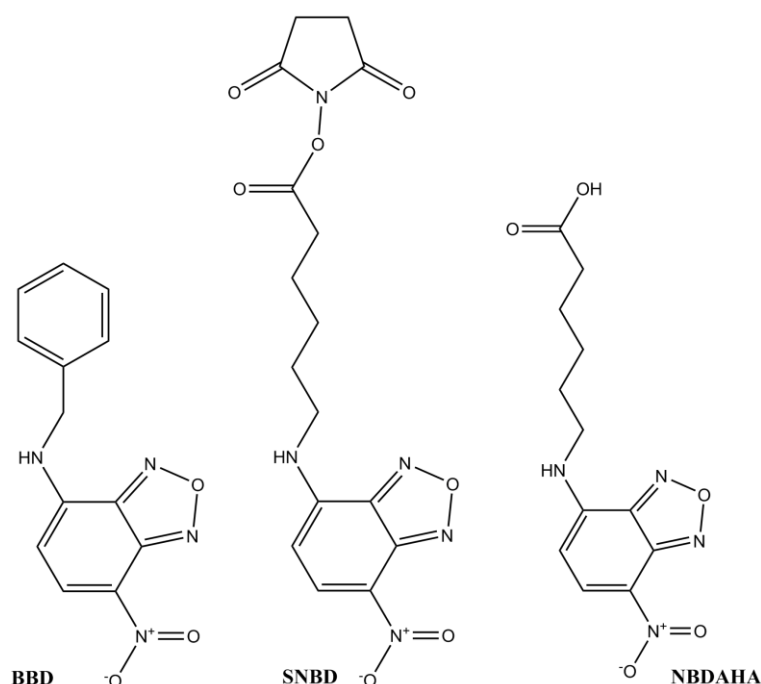


Propylamino-NBD (I) und *N,N*-Diethylamino-NBD (II) verwendet. Dabei stellte sich heraus, dass die Quantenausbeute in polaren oder protischen Lösungsmitteln abnimmt. Für Modellkomponente (I) nimmt sie von 0,027 in Wasser über 0,34 in Ethanol bis zu 0,68 in Chloroform zu. Für Komponente (II) ist sie generell deutlich geringer und kommt in Wasser auf 0,0065, in Ethanol auf 0,17 und in Chloroform auf 0,10.<sup>[FER1993]</sup>

Bei der Fluoreszenzlebensdauer sieht es ähnlich aus. Für unpolare, oder leicht polare, aprotische Lösungsmittel ist die Quantenausbeute für *n*-Propylamino-NBD näherungsweise konstant, während die Fluoreszenzlebensdauer mit Zunahme der Polarität des Lösungsmittels stufenweise sinkt. Das gleiche passiert bei protischen Lösungsmitteln. In Cyclohexan und *n*-Hexan ist die Lebensdauer triexponentiell, bei geringer Quantenausbeute. Für diesen Effekt haben Fery-Forgues et al. (1993) allerdings keine Erklärung gefunden. Je nach Modellkomponente und Lösungsmittel variiert die Fluoreszenzlebensdauer zwischen 0,4 und 11 ns.<sup>[FER1993]</sup>

Für die Untersuchung des Einflusses der Viskosität auf die Fluoreszenzlebensdauer wurden beide Modellkomponenten in Lösungsmitteln verschiedener Viskosität, aber möglichst gleicher Polarität ( $E_T(30)$  zwischen 38 und 40,4 kcal/mol) vermessen (Ethylacetat, Tripropionin, Tributyrin und Triacetin). Für Komponente I blieben die Quantenausbeute und Fluoreszenzlebensdauer konstant bei 0,67 und 10 ns. Im Falle von Komponente II verdoppelt sich jedoch die Fluoreszenzlebensdauer, wenn die Viskosität um 11 cP steigt. Fery-Forgues et al. führen dies auf eine sinkende Geschwindigkeitsrate für die nicht radiativen Prozesse ( $k_{nr}$ ) zurück. Das Verhalten von Komponente II auf Polaritäts- wie auch Viskositätseffekte erklären sie durch eine Relaxation des intramolekularen Charge Transfer angeregten Zustands (ICT) in einen energetisch niedrigeren, verdrehten Charge Transfer Zustand (TICT)<sup>[RET1988]</sup> durch Rotation um die Aminogruppen-Kohlenstoff-Stickstoff-Bindung.<sup>[FER1993]</sup>

Greenough und Blanchard (2007)<sup>[GRE2007]</sup> haben die Fluoreszenzlebensdauer und Rotationsdiffusionsdynamik des NBD-Fluorophors in protischen, aprotischen und polaren Lösungsmitteln in Abhängigkeit von den Seitengruppensubstituenten untersucht. In Abbildung 3-11 sind die drei verwendeten Chromophore dargestellt.



**Abb. 3-11** Strukturen der von Greenough und Blanchard untersuchten NBD-Chromophore: BBD (4-benzylamino-7-nitrobenzofurazan), SNBD (Succinimidyl 6-(N-(7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino)-Hexansäure), NBDAHA (6-[N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]-Hexansäure)

Die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern sind für alle drei Chromophore recht ähnlich, zeigen aber starke Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels. In Tabelle 3.8 sind die Fluoreszenzlebensdauern für die verschiedenen Chromophore und Lösungsmittel aufgelistet. Auch Blanchard und Greenough korrelieren den Verlauf der Fluoreszenzlebensdauer mit der  $E_T(30)$  Skala, in der die Polarität von Lösungsmitteln durch Messen der längstwelligen VIS/NIR-Absorptionsbande des solvatochromen Pyridinium-*N*-Phenolat-Betainfarbstoffs empirisch bestimmt werden konnte.<sup>[REI1994]</sup> Hohe  $E_T(30)$  Werte stehen dabei für eine hohe Solvenzpolarität.

**Tab. 3.1** Fluoreszenzlebensdauer der Chromophore BBD, SNBD und NBDAHA (nach: [GRE2007])

<b>LSM</b>	<b>Polarität <math>E_T(30)</math> [kcal/mol]</b>	<b><math>\tau</math> BBD [ps]</b>	<b><math>\tau</math> SNBD [ps]</b>	<b><math>\tau</math> NBDAHA [ps]</b>
<b>ACN</b>	46,00	$8385 \pm 22$	$9031 \pm 5$	$10283 \pm 51$
<b>MeOH</b>	55,5	$5585 \pm 13$	$6129 \pm 14$	$6136 \pm 21$
<b>DMF</b>	43,8	$8319 \pm 27$	$8944 \pm 16$	$9208 \pm 35$
<b>EtOH</b>	51,9	$6136 \pm 10$	$6685 \pm 24$	$7078 \pm 32$
<b>PrOH</b>	50,7	$6208 \pm 16$	$6682 \pm 46$	$7129 \pm 22$
<b>DMSO</b>	45,0	$7553 \pm 60$	$7764 \pm 52$	$8354 \pm 19$
<b>BuOH</b>	50,2	$6620 \pm 20$	$7199 \pm 17$	$7515 \pm 59$
<b>PeOH</b>	49,1	$6972 \pm 12$	$7622 \pm 23$	$7866 \pm 60$

Nimmt die Polarität des Lösungsmittels zu, so sinkt die Fluoreszenzlebensdauer des NBD-Chromophors, da dieser selbst polar ist.<sup>[FER1993], [MUK1994], [GRE2007]</sup> Ursache dafür sind Dipol-Dipol Wechselwirkungen bzw. Dipol-induzierter Dipol Wechselwirkungen zwischen Solvenz und Chromophor. Nimmt die Stärke der polaren Wechselwirkung zwischen Lösungsmittel und Chromophor zu, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit für eine strukturelle oder elektronische Änderung der Wellenfunktion des angeregten Zustands des Chromophors, wodurch der strahlungslose Zerfall des angeregten Zustands zunehmen kann.<sup>[GRE2007]</sup>

Die von Greenough und Blanchard gemessenen Rotationskorrelationszeiten sind für die drei Chromophore alle monoexponentiell. In Tabelle 3.2 sind die Ergebnisse für das NBDAHA Molekül dargestellt.

**Tab. 3.2** Rotationskorrelationszeiten  $\theta$  für NBDAHA in ps (nach: [GRE2007])

<b>LSM</b>	<b><math>\theta</math> für NBDAHA [ps]</b>
<b>ACN</b>	$52 \pm 3$
<b>MeOH</b>	$112 \pm 10$
<b>DMF</b>	$134 \pm 13$
<b>EtOH</b>	$158 \pm 13$
<b>PrOH</b>	$283 \pm 12$
<b>DMSO</b>	$204 \pm 22$
<b>BuOH</b>	$402 \pm 20$
<b>PeOH</b>	$456 \pm 4$

Wie in Kapitel 2.4 bereits erwähnt, kommen Greenough und Blanchard zu dem Schluss, dass man sich die Rotationsdynamik der Moleküle als prolaten Rotor vorstellen kann, der an der langen Achse polarisiert ist. Dabei beziehen sie sich auf die Arbeit von Chang und Eisinger.<sup>[CHU1972]</sup>

Durch das Debye-Stokes-Einstein Modell (Kapitel 2.4) wird ein Bezug der Molekülbewegung zum umgebenen Lösungsmittel hergestellt. Allerdings fallen die theoretisch berechneten Rotationskorrelationszeiten etwas kürzer aus als die experimentell bestimmten Zeiten. Als Grund kommen Reibungskräfte aufgrund von Dipol-Dipol Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen in Frage. Beides würde vermehrt bei polaren Lösungsmitteln zum Tragen kommen.<sup>[GRE2007]</sup> Da die experimentellen Ergebnisse bei den polaren Lösungsmitteln am stärksten von den theoretischen abweichen, klingt diese Vermutung durchaus plausibel.

Greenough und Blanchard (2006) haben außerdem die Fluoreszenz- und Rotationskinetik des NBD-Fluorophors in verschiedenen Lösungsmitteln, wie auch Vesikellösungen untersucht.<sup>[GRE2006]</sup> Dabei ergaben die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer, dass sich der Chromophor vorrangig in polaren Regionen aufhält. Deshalb wird der Aufenthaltsort des amphiphilen NBD-Fluorophors an der Grenzfläche Doppelmembran-Lösung in der unmittelbaren Nähe zur zwitterionischen Phosphocholin-Kopfgruppe vermutet.<sup>[GRE2006]</sup> Auch hier wird die Rotationsdynamik als die eines prolaten Rotators angenommen. Die Rotationskorrelationszeiten sind dabei unabhängig von der Vesikelzusammensetzung und liegen im Bereich von 120 ps und unterscheiden sich auch nicht zu denen in reinen Lösungsmitteln. So wird angenommen, dass die Wechselwirkungen mit den Vesikeln die Rotation der NBD-Gruppe nicht einschränken und daher ionischer Natur sind (nur wenige kcal/mol).<sup>[GRE2006]</sup>

Chattopadhyay und London (1988) haben die spektroskopischen Eigenschaften von Lipiden, die mit NBD-F gelabelt wurden in Modellmembranen mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen untersucht. Dabei stellten sie fest, dass es durch die Polarität der NBD-Gruppe zu einem Zurückdrehen dieser Gruppe hin zur Oberfläche der Membran kommt, wenn diese an das Ende einer Fettsäure gebunden ist.<sup>[CHA1988]</sup> Die NBD-Gruppe lagert sich immer bevorzugt an eine polare Region der Doppelmembran an.<sup>[CHA1987]</sup>

### Wasserstoffbrückenbindung

Lin und Struve (1991) haben den Einfluss der Polarität und der Wasserstoffbrückenbindungs-Donorstärke des Lösungsmittels auf die Fluoreszenzkinetik des NBD-Fluorophors untersucht. Dabei fanden sie heraus, dass die Kinetik der Entvölkerung des  $S_1$  Zustands stark

von der Fähigkeit des Lösungsmittels abhängt, Wasserstoffbrücken zu bilden. In aprotischen Lösungsmitteln liegt die Fluoreszenzlebensdauer zwischen 7-10 ns, während sie in Wasser nur 0,93 ns beträgt. In aprotischen Lösungsmitteln wie DMSO oder Ethylacetat wird die Fluoreszenzlebensdauer überwiegend von der Polarität des Lösungsmittels bestimmt. Während bei Alkoholen als Lösungsmittel die Fluoreszenzlebensdauer durch den Wasserstoffbrückenbindungscharakter des Lösungsmittels unter die Fluoreszenzlebensdauer in aprotischen Lösungsmitteln sinkt.<sup>[LIN1991]</sup> Messungen mit deuterierten Lösungsmitteln ergaben, dass es bei Wasserstoff liefernden Lösungsmitteln durch die Bildung zwischenmolekularer Wasserstoffbrücken zu einer Zunahme des strahlungslosen Zerfalls kommt. So soll bei NBDHA in Wasser die Bildung einer Wasserstoffbrücke im  $S_1$  Zustand zwischen dem Lösungsmittel und der Oxadiazolgruppe des NBDs die Möglichkeit des strahlungslosen Zerfalls im Vergleich zu aprotischen Lösungsmitteln erhöhen.<sup>[LIN1991]</sup>

Loura und Ranalho (2007) haben die Molekulardynamik und das Fluoreszenzverhalten von Doppelmembranen (aus 1,2-Dipalmitoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin, DPPC) untersucht, in denen die fluoreszenzgelabelten Lipidanaloga C6-NBD-PC (1-Palmitoyl, 2-[-6-NBD-amino]hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) und C12-NBD-PC (1-Palmitoyl, 2-[-12-NBD-amino]hexadecanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholin) enthalten sind. Auch hier schlingt sich die NBD-Gruppe aufgrund ihrer Polarität und Flexibilität der Acylkette an die Grenzfläche Wasser-Lipid. Dabei verfügt die NBD-Gruppe über einen großen Orientierungsbereich in der Doppelmembran. Die  $NO_2$ -Gruppe des Fluorophors ist der Grenzfläche Wasser-Lipid am dichtesten, während die NH-Gruppe an Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff des Phospholipid-Backbones des Glycerols oder zu Carbonylgruppen beteiligt ist. Beim C6-NBD-PC sind diese Wasserstoffbrücken vornehmlich intramolekular zum Glycerol-Backbone, während sie für C12-NBD-PC intermolekular zu Lipidatomen sind. Bei C6-NBD-PC führt die Kürze der *sn*-Kette, sowie das Schlingen der NBD-Gruppe zu einer räumlichen Annäherung der NH-Gruppe und den Sauerstoffatomen des Glycerol-Backbones des gleichen Moleküls, während bei der C12-Komponente die *sn*-Kette zu lang ist für ein solches Verhalten.<sup>[LOU2007]</sup>

Beim Anisotropiezerfall liegt ein biexponentielles Abklingverhalten vor bei dem eine Restanisotropie zurück bleibt (siehe nicht-assoziierter Fluoreszenzzerfall in Kap. 2.4, Gleichung 2.33). Tabelle 3-10 zeigt die experimentell ermittelten Anisotropiedaten.

**Tab. 3.3** Experimentelle Anisotropiedaten für C6-NBD-PC und C12-NBD-PC (aus: [LOU2007])

Parameter	C6-NBD-PC	C12-NBD-PC
$r_o$	0,290	0,297
$a_1$	0,77	0,55
$\theta_1$ [ns]	1,15	0,34
$a_2$	0,23	0,45
$\theta_2$ [ns]	8	3,2
$\langle\theta\rangle$ [ns]	4,4	2,5
$r_\infty$	0,031	0,030

Dabei fällt auf, dass die Rotationszeiten für die C12-Komponente etwas kürzer sind. Allgemein liegt die mittlere Rotationszeit zwischen 2,5-5 ns. Dabei liegt die kürzere im Bereich von  $\sim 1$  ns und die längere bei 3-8 ns. Nach Loura und Ramalho gehört die kurze wahrscheinlich zur Rotation des NBD-Fluorophors, während die lange die gesamte Rotation des NBD-PC Moleküls beschreibt. Zusätzlich gibt es noch eine sehr lange Rotation, da  $r(t)$  nicht auf Null sinkt, sondern eine Restanisotropie bestehen bleibt ( $r_\infty$ ). Dies ist typisch für Proben, die in eine Doppelmembran eingebettet sind („wobbling-in cone“-Typ). Da die Restanisotropie jedoch klein ausfällt, wird die Rotation durch die Doppelmembran nur schwach eingeschränkt.

Diese Beispiele sollen genügen, um die Interpretation der Messergebnisse in Kapitel 6 zu untermauern.

### 3.5 Datenauswertung

In den Kapiteln 4, 5 und 6 erfolgt die Darstellung der Ergebnisse immer als Mittelwert mit der dazugehörigen Standardabweichung.

Dabei wird der Mittelwert nach dem arithmetischen Mittel  $\bar{x}$  nach Gleichung 3.3 berechnet,

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad (3.3)$$

wobei die  $x_i$  den Einzelergebnissen entsprechen und  $n$  für die Anzahl der Einzelergebnisse, bzw. Anzahl der durchgeführten Messungen steht. Die Standardabweichung beschreibt die Streuung der Einzelergebnisse um ihren Mittelwert und wird als  $\sigma_i$  nach Gleichung 3.4 aus der Quadratwurzel der Varianz erhalten.

$$\sigma_x = \sqrt{\text{Varianz}(x)} \quad (3.4)$$

Diese beschreibt die mittlere quadratische Abweichung der Einzelergebnisse einer Stichprobe um ihren Mittelwert (Gleichung 3.5)

$$\text{Varianz}(x) = \frac{(\bar{x}-x_1)^2 + (\bar{x}-x_2)^2 + \dots + (\bar{x}-x_n)^2}{n} \quad (3.5)$$

In Kapitel 6.1 wird zusätzlich untersucht, ob sich Proben, die in einem Plasmaparameter voneinander abweichen in ihrem Fluoreszenzverhalten so stark voneinander unterscheiden, dass diese Proben mit hoher Sicherheit unterschieden werden können. Dazu wird der Zweistichproben-t-Test angewendet.

### Zweistichproben-t-Test

Voraussetzung für die Anwendung dieses Hypothesentests ist das Vorliegen zweier Teilstichproben mit den Erwartungswerten  $X_1, X_2, \dots, X_n$  und  $Y_1, Y_2, \dots, Y_m$ .

Ausserdem müssen die Varianzen der beiden Teilproben homogen sein ( $\sigma_x^2 = \sigma_y^2$ ) und beide Proben müssen unabhängig voneinander gemessen worden sein.

Dann wird die Hypothese  $H_0$  aufgestellt, das sich die beiden Proben nicht voneinander unterscheiden lassen, da ihre Mittelwerte gleich sind.

$$H_0 : \bar{x} = \bar{y} \quad (3.6)$$

Anschließend wird versucht diese Hypothese zu widerlegen. Dazu wird zunächst die t-verteilte Statistik  $T$  mit  $(m + n - 2)$  Freiheitsgraden betrachtet.

$$T = \frac{\bar{x}_n - \bar{y}_m}{\sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{m}} \sigma_p} \quad (3.7)$$

Hier stehen  $n$  und  $m$  für die jeweilige Größe der Stichprobe (Anzahl der Messungen) und die gewichtete Varianz  $\sigma_p$  ergibt sich nach Gleichung 3.8 zu:

$$\sigma_p^2 = \frac{(n-1)\sigma_{x,n}^2 + (m-1)\sigma_{y,m}^2}{n+m-2} . \quad (3.8)$$

Ist die Hypothese  $H_0$  in Gleichung 3.6 erfüllt, so sollte das Ergebnis aus Gleichung 3.7 für  $T$  nahe Null liegen. Je größer  $T$  wird, desto eindeutiger lassen sich die Mittelwerte der Erwartungswerte ( $\bar{x}$  und  $\bar{y}$ ) beider Proben unterscheiden, die Hypothese also widerlegt. Die Beschreibung des Zweistichproben-t-Tests orientiert sich an einem Buch über Statistik in Theorie und Praxis <sup>[FAL2014]</sup>, für genauere Erklärungen wird auf dieses Werk verwiesen.

## 4 Plasmaaminierte Hohlfasermembrane

Bevor in diesem Kapitel die Ergebnisse der Untersuchungen an den plasmaaminierten Hohlfasermembranen dokumentiert werden, wird zunächst Näheres über dessen Herstellungsverfahren und Anwendungsgebiet berichtet. Zusätzlich wird auf die Probenvorbereitung und die Fluoreszenzmarkierung eingegangen.

### 4.1 Herstellung und Anwendung

An dieser Stelle wird auf die Herstellung und Anwendung der in Kapitel 4.3 fluoreszenzmikroskopisch untersuchten Hohlfasermembrane eingegangen.

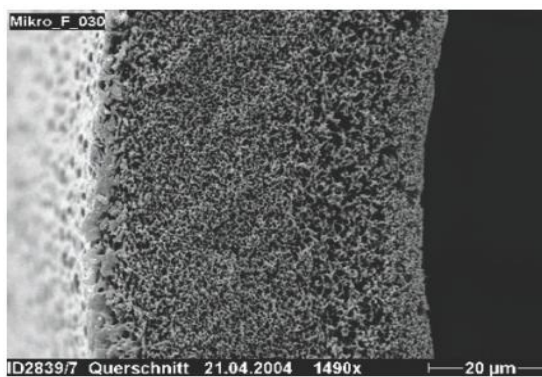
Hohlfasermembrane können beispielsweise im Nassspinnverfahren aus Polymeren hergestellt werden. Durch ihre poröse Struktur besitzen diese Oberflächen eine breite Anwendung als Filter.

Die Firma Gambro GmbH aus Hechingen setzt funktionalisierte Hohlfasermembrane in der Medizintechnik bei chronischem und akutem Nierenversagen, sowie Leberversagen ein. Dabei agiert die Membran als Plasmafilter in der Dialyse.

Durch einen Größenausschluss über die Porengröße und spezifische Absorption durch die Oberflächenfunktionalisierung mittels Aminogruppen können Blutzellen und Blutplasma voneinander getrennt werden. Die Funktionalisierung erfolgt durch ein Ammoniak haltiges Niederdruckplasma und durch nasschemische Prozesse. Die Polymermembran selbst wird aus den beiden Polymeren Polyarylethersulfon (P(A)ES) und Polyvinylpyrrolidon (PVP) hergestellt.<sup>[BEC2005]</sup> Die gewonnenen Hohlfasermembranen besitzen einen äußeren Durchmesser von ca. 320  $\mu\text{m}$  und eine Wandstärke von ca. 50  $\mu\text{m}$ . Die Porengröße liegt bei  $\sim 0,3 \mu\text{m}$ .<sup>[REM2010]</sup>

In Abbildung 4-1 ist ein Rasterelektronen-(REM)-Bild einer ähnlichen Hohlfasermembran der Gambro GmbH zu sehen.





**Abb. 4-1** Rasterelektronen-(REM)-Bild einer ähnlichen Hohlfasermembran der Firma Gambro GmbH, Hechingen

Um eine homogene Aminogruppendichte mit hoher Eindringtiefe zu erreichen, die letztendlich unabdingbar für den Einsatz als Plasmafilter ist, müssen bei der Plasmafunktionailierung die verschiedenen Einflussfaktoren auf die Funktionalisierung während des Plasmaprozesses im richtigen Verhältnis zueinander stehen. Zu den Einflussgrößen gehören der Gasdruck, die Leistung, die Prozesszeit, die Gaszusammensetzung und der Gasfluss.

Mit Hilfe der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie ist es möglich, die Homogenität und Eindringtiefe der Aminogruppen zu bestimmen und so den Fortschritt in der Prozessoptimierung visualisiert zu verfolgen.

In Zusammenarbeit mit der Gambro GmbH wurden mehrere Hohlfasermembran-Probenansätze erhalten, welche sich hinsichtlich der Parameter, die den Plasmaprozess beeinflussen, unterscheiden.

Ziel war es, die Homogenität wie auch Eindringtiefe innerhalb einer Probe zu bestimmen, wie auch zu ermitteln, in wie weit sich die verschiedenen Proben mit anderen Prozessparametern hinsichtlich der Funktionalisierung unterscheiden lassen, um am Ende die optimalen Parameter bestimmen zu können.

Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.3 behandelt.

## 4.2 Labeling der Hohlfasermembrane

In diesem Unterkapitel wird die Herstellung der Fluoreszenzproben erläutert.

Das im Markeringsverfahren verwendete Ethanol (EtOH) wurde von Sigma-Aldrich bezogen und entsprach der HPLC-Reinheit. Restliches Wasser ist mit Hilfe von Natriumsulfat entfernt worden. Als Farbstoff für die Erzeugung der Fluoreszenz in den Proben wurde 4-Fluoro-7-

nitrobenzofurazan (NBD-F) verwendet. Der Farbstoff wurde ebenfalls von Sigma-Aldrich bezogen.

Für die Fluoreszenzmarkierung der Hohlfasermembrane wurde zunächst eine 1mM Lösung aus NBD-F in trockenem Ethanol hergestellt. Anschließend wurden drei Membranen einer Probe in je eine Glasschale gelegt und mit der Farbstofflösung übergossen. Die Glasschale wurde lichtdicht verschlossen und auf eine Rüttelplatte gestellt. Dadurch wurde gewährleistet, dass der Farbstoff möglichst tief in die Molekülstruktur der Hohlfasermembranen eindringen kann. Die Reaktion wurde nach 40 Minuten beendet, indem die Membranen dreimal mit Ethanol abgespült und dann im Stickstoffstrom getrocknet wurden. Danach wurden die drei Fasern auf einen Objektträger aufgebracht und mit dem Immersionsöl Immersol 518 F von Zeiss bestrichen, bevor das Deckgläschen aufgesetzt wurde.



**Abb. 4-2** Schema zur Aufnahme eines Querschnittsbildes (links) und auf den Objektträger aufgebrachte, gelabelte Hohlfasermembrane (rechts)

Anschließend erfolgte die eigentliche Messung am Fluoreszenzmikroskop, wobei mindestens 10 Querschnittsbilder einer Probe aufgenommen wurden, um eine statistische Sicherheit bei den Messergebnissen zu erreichen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die verwendeten Messparameter.

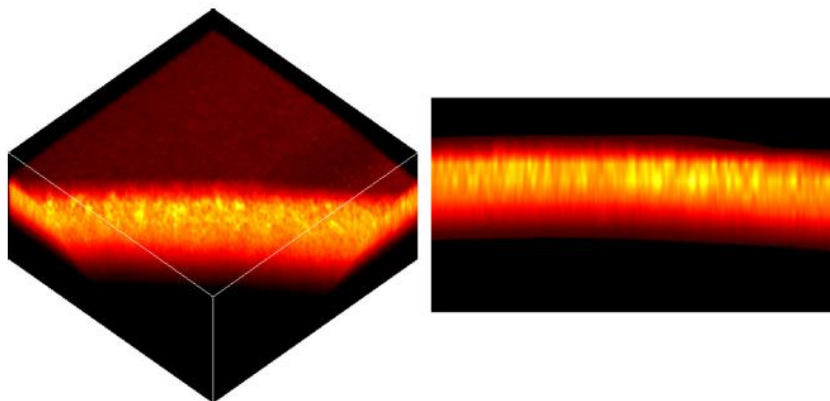
**Tab. 4.1** Messparameter der Fluoreszenzintensitätsmessungen an den Hohlfasermembranen

Parameter	Einstellung
Zeitauflösung	128 ps
Ortsauflösung	0,4 $\mu\text{m}/\text{px}$
Scanmodus	10x0,2 ms/px (bidirektional)
Wellenlänge	920 nm
Filter	BG 39, IF 530 $\pm$ 20 nm
Fläche	$\Delta x$ 100 $\mu\text{m}$ x $\Delta y$ 50 $\mu\text{m}$ (250 x 125 Pixel)
Obektiv	40x Ölimmersionsobjektiv
Laserleistung	22 mW (hinter Polarisator)

### 4.3 Querschnitts-Imaging von Aminogruppen auf plasmaaminierten Hohlfasermembranen

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung von plasmaaminierten Hohlfasermembranen erfolgte erstmals von Ehlers (2011) und wird in dieser Arbeit fortgeführt. Diese Untersuchungsmethode soll dazu dienen die Eindringtiefe und Homogenität der Aminogruppenverteilung innerhalb der porösen Probenstruktur zu bestimmen und sichtbar zu machen. Ziel ist es, den Plasmaprozess dahin gehend zu optimieren, dass eine möglichst tiefe und homogene Funktionalisierung erreicht wird. Die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie wird dabei zur Qualitätsprüfung eingesetzt.

Das Anwendungsgebiet und der allgemeine Herstellungsprozess der Hohlfasermembrane wurden in Kapitel 4.1 behandelt. Über die Vorbereitung der fluoreszenzmarkierten Proben und die Zielsetzung dieser Untersuchungsmethode wurde in Kapitel 4.2 ausführlich berichtet. Ehlers (2011) hat in seinen Untersuchungen herausgestellt, dass der Informationsgehalt eines einfachen Querschnittsbildes vergleichbar mit dem eines aufwendig 3D gerenderten Bildes ist.



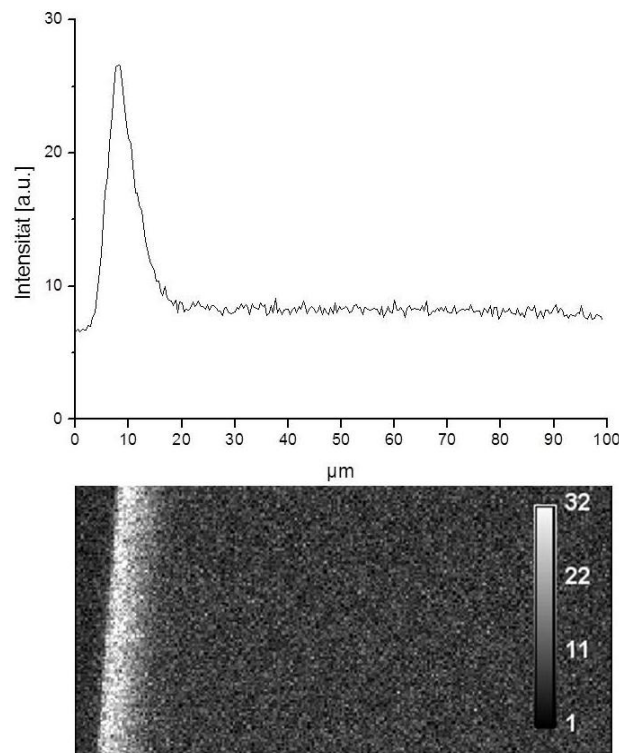
**Abb. 4-3** gerendertes 3D-Bild eines  $50 \times 50 \times 30 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans auf der linken Seite (leicht angeschnittene Schrägaufsicht) und auf der rechten Seite die dazugehörige Seitenansicht <sup>[EHL2011]</sup>

In Abbildung 4-3 ist ein solches 3D-Bild einer plasmaaminierten Hohlfasermembran in Schräg- und Seitenansicht zum Vergleich dargestellt. <sup>[EHL2011]</sup>

Da es in den Untersuchungen in dieser Arbeit darum geht, möglichst viele Proben mit hoher statistischer Sicherheit zu untersuchen und untereinander zu vergleichen, wurden nur Querschnittsbilder aufgenommen und analysiert. Der Zeit- und Rechenaufwand hätte bei so einer großen Versuchsmatrix im keinen Verhältnis zum zusätzlichen Informationsgehalt gestanden (untersucht wurden 10 Proben mit jeweils 10 Einzelmessungen für die statistische Auswertung). Dazu wurden  $100 \times 50 \mu\text{m}^2$  große Flächen in der Querschnittsebene der

Membran abgescannt. Anschließend wurde mittels ImageJ ein Verteilungsprofil der Aminogruppen erstellt.

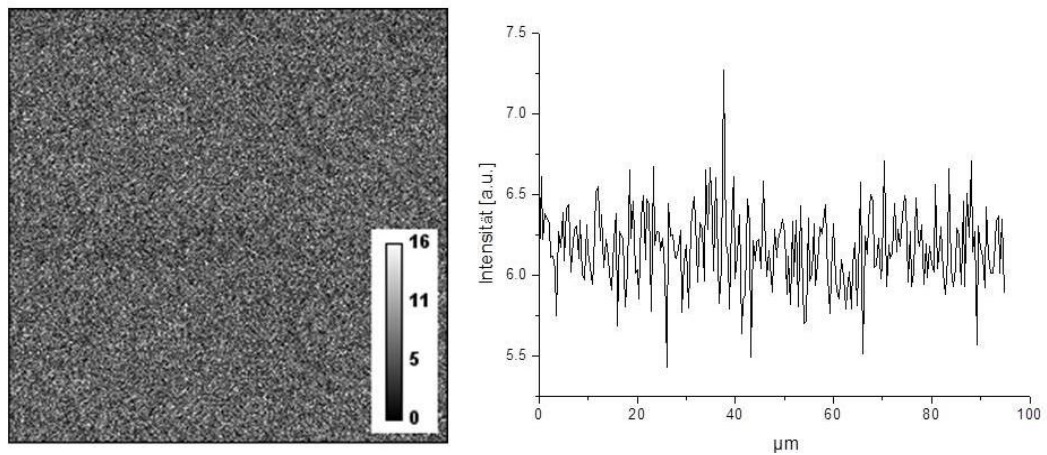
Um sicher zu gehen, dass das Fluoreszenzsignal auch proportional zur Aminogruppendichte auf den Membranen ist und nicht noch andere Stoffe zur Fluoreszenz angeregt werden, wurde zunächst eine plasmafunktionalisierte Probe ohne Anbindung des Fluoreszenzfarbstoffs vermessen. Das Ergebnis zeigt Abbildung 4-4.



**Abb. 4-4** Querschnittsbild ( $50 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) der Fluoreszenz einer aminofunktionalisierten Hohlfasermembran aus Probe 10 ohne Farbstoffmarkierung (unten) und das dazugehörige Intensitätsprofil (oben)

Im oberen Teil ist das gewonnene Verteilungsprofil der Signalstärke zu sehen, während im unteren Bereich das dazugehörige Bild der Fluoreszenzintensität in Graustufen dargestellt ist. Dabei nimmt die Fluoreszenzintensität von schwarz über grau nach weiß zu. Generell werden bei dieser plasmafunktionalisierten Membran ohne Fluoreszenzfarbstoff, der die Aminogruppen zum Leuchten bringt, nur sehr geringe Intensitäten gemessen. Der größte Bereich der Membran erzielt ein Rauschen zwischen 8 und 10 Counts. Während links im Bild, wo die Faser noch nicht angefangen hat und nur Hintergrundsignal ist, ca. 7 Counts gezählt wurden. Die Membran zeigt also überwiegend keine Eigenfluoreszenz. Lediglich an der äußeren Kante der Membran wird ein leichtes Fluoreszenzsignal mit einem Maximum von 27 Counts über den Durchschnitt der 50 µm lange Seite erhalten. Es ist nicht ganz klar, warum dort eine geringe Intensität messbar ist. Denkbar wäre, dass der Plasmaprozess dazu beigetragen hat. Als nächstes folgt ein Querschnittsbild einer Referenzmembran, die der

Plasmafunktionalisierung nicht ausgesetzt wurde, die also keine Aminogruppen aufweist (Abb. 4-5).

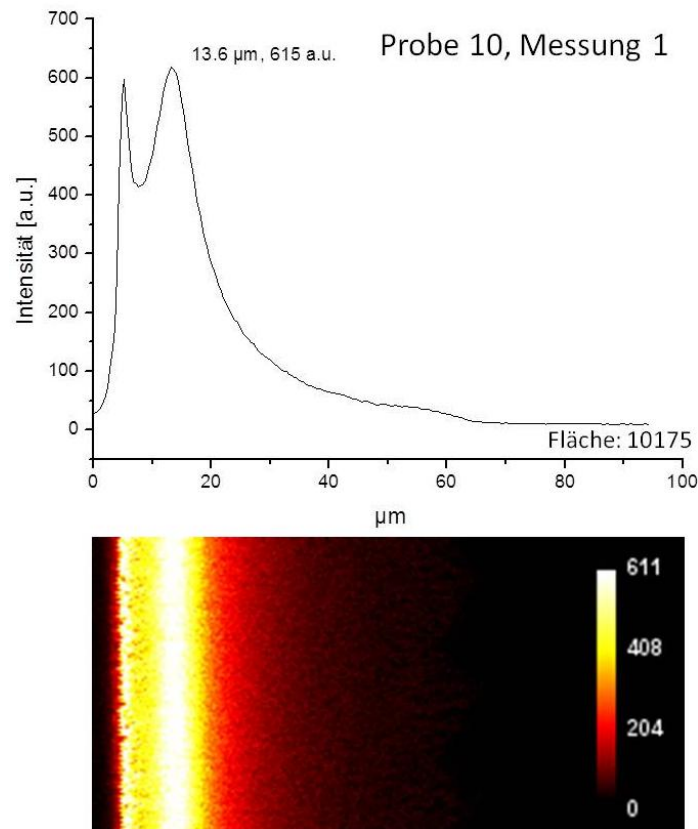


**Abb. 4-5** Intensitätsbild ( $100 \times 100 \mu\text{m}^2$ ) einer unbehandelten Faser als Referenz (links) und das entsprechende Profil (rechts)

Die Abbildung zeigt einen Abschnitt von  $50 \times 50 \mu\text{m}^2$  der Referenzmembran. Diesmal ist keinerlei Fluoreszenzsignal neben dem Hintergrundrauschen zu sehen. Die Hohlfasermembranen zeigen also keine Eigenfluoreszenz. Lediglich durch den Plasmaprozess wird eine kleine Signalerhöhung an der äußeren Kante der Membran hervorgerufen. Die aber zu vernachlässigen ist, da die Intensität in den funktionalisierten Proben um ein Vielfaches höher ist (siehe Abb. 4-4).

Es bleibt festzuhalten, dass sich die Membranen gut eignen, um die Aminogruppenfunktionalisierung mittels Fluoreszenzmarkierung mit NBD-F sichtbar zu machen und das erhaltene Fluoreszenzsignal proportional zur Aminogruppenkonzentration ist, da keine Störsignale zu erwarten sind.

Im Folgenden wird exemplarisch ein Querschnittsbild von Probe 10 zusammen mit dem zugehörigen Querschnittsprofil dargestellt.



**Abb. 4-6** Im unteren Teil: Querschnittsbild der Fluoreszenzintensität (Aminogruoendichte) einer Hohlfasermembran aus Probe 10, im oberen Teil: zugehöriges Profil mit Flächenangabe aus der Integration, maximale Intensität des 2. Peaks

Hier wurde für die Darstellung der Fluoreszenzintensität die Skala „Red Hot“ in ImageJ verwendet, da dort kleine Intensitätsunterschiede besser zur Geltung kommen als im einfachen Graustufenbild.

Die äußere Kante der Hohlfasermembran ist sehr gut zu erkennen. Auffällig ist, dass die maximale Intensität nicht direkt an dieser Kante zu finden ist, sondern etwas weiter im inneren der Membran. Ein Grund dafür, der auch schon bei Ehlers (2011) aufgegriffen wurde, ist die größere Porenstruktur im oberflächennahen Raum der Membran.<sup>[EHL2011]</sup> Dadurch kommen größere Hohlräume, bzw. weniger Polymerstruktur, die mit den fluoreszenzmarkierten Aminogruppen besetzt ist, zu Stande. Als Ergebnis befinden sich weniger Aminogruppen im Messvolumen und die Signalintensität ist niedriger als weiter innen in der Membran, wo die Porenstruktur kleiner ist und sich somit mehr Aminogruppen innerhalb des Fokalvolumens aufhalten.

Nach dem Maximum, welches bei 13,6 μm erreicht wird, sinkt die Aminogruppenkonzentration exponentiell ab. Bei etwa 60 μm ist im Intensitätsbild wie auch im Querschnittsprofil ein kleiner Abfall zu sehen. Dieser deutet den Faserrand an. Da die Membran nicht direkt an der linken Seite des Bildes anfängt, sondern ein paar μm später, ist

dieser Wert gut mit der vom Hersteller genannten Wandstärke von ca. 50  $\mu\text{m}$  vereinbar. Auffällig im Intensitätsbild ist, dass dieser Abfall nicht entlang einer geraden Kante verläuft, sondern leicht ausgefrantzt ist. Dies könnte bedeuten, dass der innere Faserrand nicht ganz glatt ist, sondern leicht gewellt. Oder aber, dass die Aminogruppenverteilung so tief in der Membran nicht mehr homogen ist. Da der Farbstoff aber größer ist als die Substanzen, die im Plasmaprozess die Aminogruppen bilden (Stickstoffatome,  $\text{NH}_x$ -Radikale und angeregter Distickstoff), ist es genauso möglich, dass der Farbstoff nicht immer bis in den letzten Bereich der Faser eindringen konnte, die Aminogruppen dort aber vorhanden sind. Ausführlicher wurde diese Diskussion in der Arbeit von Ehlers geführt.<sup>[EHL2011]</sup>

Um die Proben, die mit unterschiedlichen Prozessparametern funktionalisiert wurden, vergleichen und bewerten zu können, wurden zu jeder Einzelmessung bestimmte Parameter festgehalten und tabelliert. Dazu gehören die maximale Intensität des intensivsten (zweiten) Peaks, sowie die Gesamtfläche unter der Intensitätskurve (siehe Abbildung 4.4, oben). Hierfür wurde über die gesamte Scanfläche integriert. Da die Intensität proportional zur Aminogruppenkonzentration ist, beschreibt die Gesamtfläche des Signals die relative Aminogruppendichte. Je größer die Fläche, desto höher die Aminogruppenfunktionalisierung durch den Plasmaprozess. In Tabelle 4.2 sind die integralen Flächen aller Einzelmessungen für alle vermessenen Proben mit zugehörigem Mittelwert und der Standardabweichung vom Mittelwert angegeben (die Datenauswertung wurde in Kapitel 3.5 beschrieben).

Die Probe, die dort den größten Mittelwert besitzt, liefert die größte Aminogruppenfunktionalisierung. Als Maß für die Homogenität der Funktionalisierung auch über mehrere Fasern einer Probe hinweg (es wurden immer mindestens drei unterschiedliche Fasern einer Probe vermessen), kann die Standardabweichung angesehen werden. Fällt diese klein aus, so verläuft die Plasmafunktionalisierung homogen.

Wie zu erwarten war, zeigen sich Differenzen in der Intensität und dem Tiefenprofil zwischen den einzelnen Proben, aber auch die Ergebnisse innerhalb einer Probe zeigen eine große Schwankungsbreite. Um statistisch noch sicherere Ergebnisse zu erhalten, müsste eine viel größere Anzahl an Einzelmessungen innerhalb einer Probe durchgeführt werden, zumal eine Einzelmessung nur eine Fläche von  $50 \times 100 \mu\text{m}^2$  abdeckt.

Im Anhang ist eine kleine Auswahl weiterer Intensitätsbilder mit zugehörigem Profil dargestellt. Diese ermöglicht es einen kleinen Überblick über die genannten Schwankungen zu bekommen.

Nach den tabellierten Flächengrößen liefern Probe 6 und 8 die meisten Aminogruppen auf den Hohlfasermembranen. Für die Optimierung des Plasmaprozesses bedeutet dies, dass die für



diese Proben gewählten Plasmaparameter von den hier untersuchten am geeignetsten sind, um hohe Aminogruppendichten zu erzielen und die Prozessentwicklung in Richtung dieser Parameter weiterverfolgt werden sollte.

**Tab. 4.2** Ergebnis der Flächenintegration unter den Intensitätsprofilen der Einzelmessungen mit Mittelwertbildung und Angabe der Standardabweichung. Die Werte geben die mittlere relative Aminogruppendichte auf den Hohlfasermembranen an.

Messung	Flächen (Integrale)									
	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
1	43030	25669	24252	17369	17740	19035	17920	19420	23286	10175
2	25843	25147	22023	20592	20122	19402	28409	32389	23286	16832
3	33204	26257	18750	20592	41470	28558	18003	33577	19339	22994
4	27969	31994	29604	25942	22187	34895	12583	25855	19073	13577
5	13171	14322	21027	26714	21998	31284	30545	28147	20729	12880
6	17595	43606	46538	25142	29097	34342	39975	32737	16344	12016
7	22411	18928	19319	29732	13649	34423	26035	34233	22753	16749
8	36335	15824	26735	30814	27591	42910	35313	28481	22763	12348
9		15797	26492	21679	19841	37353	33234	49397	23647	15863
10		20686	28191	11121	18753		25054			
11			27354	20544			22200			
12			36883							
Mittelwert	27445	23823	27264	22965	23245	31356	26297	31582	21247	14826
Stabwn	9247	8495	7540	5655	7429	7475	7888	7692	2388	3598



Es gibt in Tabelle 4.2 neben den Proben 6 und 8 aber auch einige weitere, die auf den ersten Blick sehr ähnliche Ergebnisse liefern. Um leichter entscheiden zu können, ob diese Proben sich voneinander unterscheiden lassen, wurde der Stichproben-*t*-Test angewendet (siehe Kapitel 3.5).

Das Ergebnis ist in Tabelle 4.3 dargestellt. Dort ist gut zu erkennen, dass sich die Proben 1 und 7 beispielsweise mit 90 %iger Sicherheit nur von den Proben 9 und 10 unterscheiden lassen. Für alle weiteren Proben ist keine Unterscheidung möglich. In Probe 10 haben die gewählten Plasmaparameter hingegen so einen großen Einfluss auf die Funktionalisierung, dass diese Probe sich von allen anderen gut unterscheiden lässt. Betrachtet man das Ergebnis der Flächenbestimmung, so ist festzustellen, dass Probe 10 mit einem Mittelwert von ca. 15000 a.u. die geringste Aminogruppendichte aufweist. Die gewählten Plasmaparameter erweisen sich demnach nicht als geeignet, da es darum geht eine möglichst große und homogene Aminogruppendichte auf den Hohlfasermembranen zu realisieren.

**Tab. 4.3** Ergebnis des Stichproben-*t*-Tests. Die Tabelle zeigt an, welche Proben sich mit 90 %iger Wahrscheinlichkeit voneinander unterscheiden lassen.

90 Prozent	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10
Probe 1		nein	nein	nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja
Probe 2	nein		nein	nein	nein	ja	nein	ja	nein	ja
Probe 3	nein	nein		nein	nein	nein	nein	nein	ja	ja
Probe 4	nein	nein	nein		nein	ja	nein	ja	nein	ja
Probe 5	nein	nein	nein	nein		ja	nein	ja	nein	ja
Probe 6	nein	ja	nein	ja	ja		nein	nein	ja	ja
Probe 7	nein	nein	nein	nein	nein	nein		nein	ja	ja
Probe 8	nein	ja	nein	ja	ja	nein	nein		ja	ja
Probe 9	ja	nein	ja	nein	nein	ja	ja	ja		ja
Probe 10	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	ja	

Die bei der Plasmafunktionalisierung verwendeten Prozessparameter sollen und können hier nicht im Einzelnen genannt werden, da es sich um eine Untersuchung aus der Produktforschung der Gambro GmbH handelt und diese Parameter der Geheimhaltung unterliegen. Diese sind aber auch nicht von Belang, um zu zeigen, dass diese Methode der Fluoreszenzmikroskopie in den Materialwissenschaften gut angewendet werden kann, wenn es um die Visualisierung von Aminogruppen auf funktionalisierten Oberflächen geht.

## 5 Funktionalisierte Keramikröhrchen

Bevor in diesem Kapitel die Ergebnisse der Untersuchungen an den funktionalisierten Keramikröhrchen dokumentiert werden, wird zunächst Näheres über dessen Herstellungsverfahren und Anwendungsgebiet berichtet. Zusätzlich wird auf die Probenvorbereitung und die Fluoreszenzmarkierung eingegangen.

### 5.1 Herstellung und Anwendung

Heutzutage ist die Entwicklung von keramischen Mikroröhrchen aufgrund ihrer besonderen chemischen, thermischen und mechanischen Eigenschaften in der Membrantechnologie nicht mehr weg zu denken.<sup>[KRO2010]</sup>

Ein großes Einsatzgebiet liegt in der Trinkwasseraufbereitung in Entwicklungsländern.

In der Arbeitsgruppe Advanced Ceramics der Uni Bremen werden mit Yttrium stabilisierte Zirkondioxid Membranröhrchen entwickelt, die in der Trinkwasseraufbereitung als Virenfilter eingesetzt werden können. Ziel ist es, durch Wasser übertragbare Krankheiten, die beispielsweise durch Adenoviren, Enteroviren, Rotaviren oder Hepatitis A und E ausgelöst werden, einzudämmen.<sup>[WER2014]</sup>

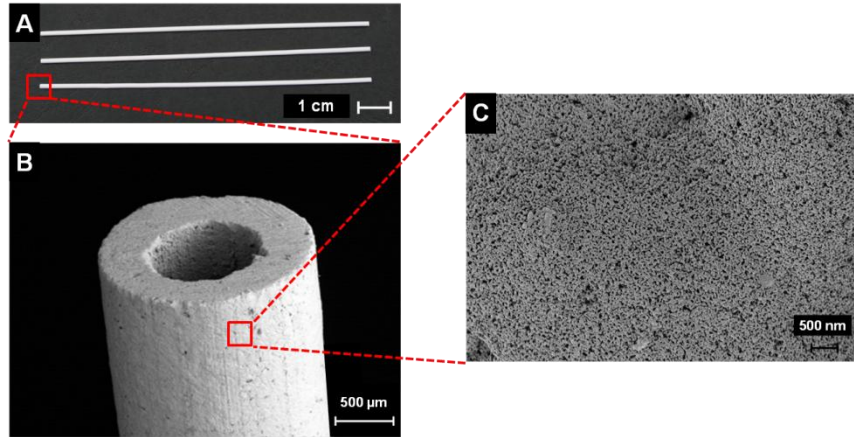
Bei diesen Virenfiltern erfolgt die Filterfunktion einmal durch die Porenstruktur der Membran, deren Porengröße mit ca. 2-100 nm kleiner ist als die Viren, die in der Größenordnung von 20 bis 300 nm liegen<sup>[ARN2007]</sup> und somit einen Größenausschluss erwirken. Zusätzlich werden die Viren durch einen Adsorptionseffekt zurückgehalten.

Als Modellvirus dient ein Bakteriophage in der Form von MS2. Dieser weist einen isoelektrischen Punkt (IEP) von 3,9 auf, ist also unter neutralen pH Bedingungen negativ geladen. Funktionalisiert man nun die Keramikmembran so, dass diese bei einem pH Wert von 7 positiv geladen ist, so werden die Viren nicht nur durch die Porenstruktur zurück gehalten, sondern werden zusätzlich durch Ladung absorbiert.

Nach Filtration lässt sich die Membran einfach durch einen pH Shift in den sauren, oder alkalischen pH Bereich reinigen, da dort die Viren wieder desorbiert werden.

Die positiv geladene Membran wird durch eine Funktionalisierung mit Aminosilanen erreicht, deren IEP bei 9-10 liegt.

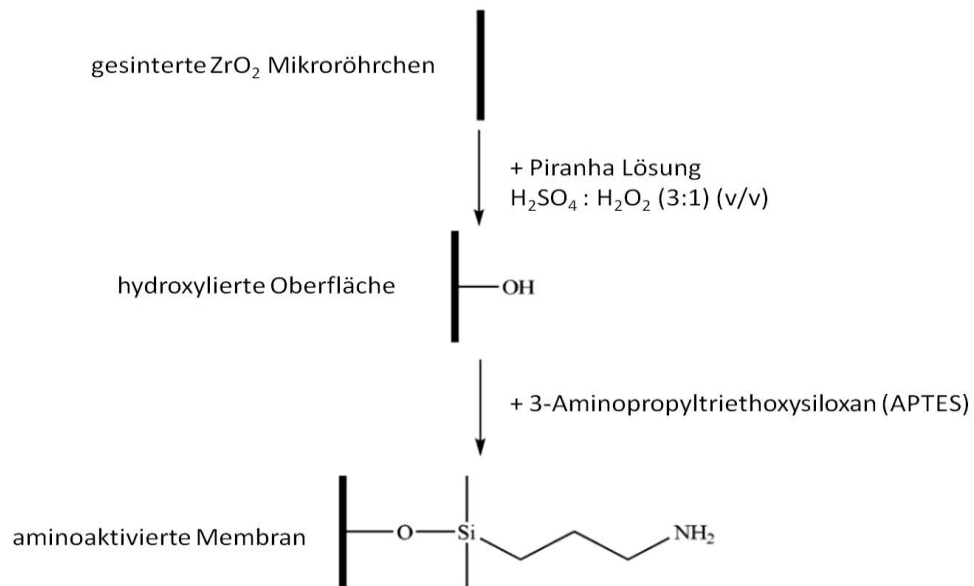
Die Abbildung 5-1 zeigt REM Aufnahmen solcher Mikromembranröhrchen in verschiedenen Vergrößerungen. Der Wandstärke der Membranen liegt bei ca. 400  $\mu\text{m}$ .



**Abb. 5-1** REM Bild von gesinterten  $\text{ZrO}_2$  Membranen mit durchschnittlicher Porengröße von 30 nm im Überblick (A) und im Detail (B und C) <sup>[KRO2012b]</sup>

In Bild A wird ein Gesamtüberblick über die Größenordnung solcher Mikromembranen gegeben. In den Bildern B und C nimmt die Vergrößerung zu und die Porenstruktur wird immer deutlicher.

Die Keramikmembranen werden bei 1050°C aus Yttrium stabilisierten Zirkondioxidpulvern (YSZ) gesintert. Diese Röhrchen sind zunächst inert und müssen aktiviert werden, damit funktionale Gruppen anbinden können. Der Weg der Silanisierung der Röhrchen ist in Abbildung 5-2 dargestellt.



**Abb. 5-2** Funktionalisierung der gesinterten  $\text{ZrO}_2$  Mikroröhrchen mit Piranha Lösung und anschließende Ankopplung von APTES <sup>[KRO2012a]</sup>

Im ersten Schritt werden die Keramikröhrchen durch eine Hydroxylierung aktiviert. Dies geschieht mit einer Piranha Lösung aus Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) und Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) im Volumenverhältnis 3:1. Die Reaktion verläuft unter Raumtemperatur in 30 Minuten. Danach werden die Röhrchen fünfmal mit Wasser gewaschen bis ein neutraler pH Wert erreicht ist.

Mit Hilfe einer Titrationsmethode wurde die Beladungskapazität der Röhrchen auf 1.2 OH-Gruppen pro  $\text{nm}^2$  bestimmt und ist somit groß genug um Aminosilane an die Oberfläche anzukoppeln. <sup>[KRO2012a]</sup>

Der Prozess der Silanisierung wird in einem Thermomixer bei 75 °C über eine Dauer von 16 Stunden durchgeführt, als Lösungsmittel wird deionisiertes Wasser verwendet. Um ungebundene, oder nur schwach gebundene Aminosilane zu entfernen, erfolgt auch hier anschließend ein Waschprozess. <sup>[KRO2012a]</sup>

Als Aminosilane wurden 3-Aminopropyltriethoxysiloxan (APTES) mit einer endständigen primären Aminogruppe und *N*-(2-Aminoethyl)-3-aminopropyltriethoxysilan (AE-APTES) mit einer zusätzlichen sekundären Aminogruppe innerhalb der Alkylkette verwendet.

Die in dieser Arbeit angewendete Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie soll einen Einblick in die Funktionalisierung der Membranen mit den Aminosilanen geben, da diese Methode nach der Fluoreszenzmarkierung mit Aminogruppen spezifischen Farbstoffen einen Einblick in die Homogenität der Aminosilanverteilung innerhalb der Keramikmembranen liefert. Durch ein dreidimensionales Abrastern der Membranproben ist es vor allem möglich

Aussagen über die Eindringtiefe dieser Aminogruppenfunktionalisierung in die poröse Porenstruktur zu treffen.

Damit die Keramikfilter gut als Virenfilter in der Trinkwasseraufbereitung angewendet werden können, ist es wichtig, dass diese Funktionalisierung homogen ist und möglichst tief in das Innere der Membran hinein reicht, damit die Viren gut absorbiert werden und auch das Reinigen der Filter rückstandslos funktioniert.

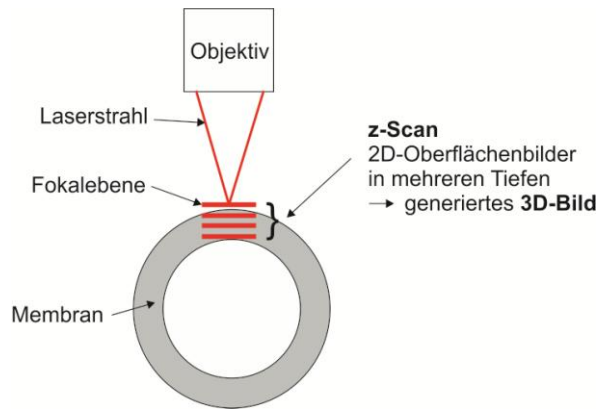
In Kapitel 5.3 werden die Ergebnisse der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie Untersuchungen der Mikromembranröhrchen mit APTES und AE-APTES Funktionalisierung vorgestellt.

## 5.2 Labeling der Keramikröhrchen

In diesem Unterkapitel wird die Herstellung der Fluoreszenzproben erläutert.

Das im Markeringsverfahren verwendete Ethanol (EtOH) wurde von Sigma-Aldrich bezogen und entsprach der HPLC-Reinheit. Restliches Wasser ist mit Hilfe von Natriumsulfat entfernt worden. Als Farbstoffe für die Erzeugung der Fluoreszenz in den Proben wurden 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) und Fluorescamin (Fluram®) angewendet. Beide Farbstoffe wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

Das Labeling der Keramikröhrchen erfolgte analog zu dem der Hohlfasermembrane, welches in Kapitel 4.2 zu finden ist, nur wurden hier zusätzlich Messungen an mit Fluorescamin gelabelten Proben durchgeführt. Hierfür wurde zunächst eine 1 mM Lösung von Fluorescamin in trockenem Ethanol hergestellt und anschließend analog wie zum Labeling mit NBD-F vorgegangen. Aufgrund der schnelleren Reaktionsgeschwindigkeit konnte die Reaktion mit Fluorescamin bereits nach 15 Minuten durch den Spülvorgang beendet werden. Da die Keramikröhrchen um einiges größer sind als die Hohlfasermembrane (Kapitel 4), konnten hier für die Bestimmung der Eindringtiefe der Amine in die Porenstruktur nur schwer Querschnittsbilder aufgenommen werden. Die schlechte Transparenz der Probe, sowie der geringe Arbeitsabstand der Objektive erschwerte die Aufnahme von Bildern aus der Querschnittsebene zusätzlich, so dass bei diesen Proben neben einigen Querschnittsbildern überwiegend 3D Scans durchgeführt wurden. Diese liefern potentiell einen höheren Informationsgehalt, nehmen jedoch auch einen viel größeren Zeitaufwand in Anspruch und verbrauchen deutlich mehr Rechenleistung und Speicherplatz. In Abbildung 5-3 ist das Schema eines 3D Scans an einem Keramikröhrchen dargestellt.



**Abb. 5-3** Schema zur Messung mehrerer Ebenen in unterschiedlichen Tiefen der Probe zur Generierung eines dreidimensionalen Bildes

Die Messparameter sind in Tabelle 5.1 aufgeführt.

**Tab. 5.1** Messparameter der Fluoreszenzintensitätsmessungen an den Keramikröhrchen

Parameter	Einstellung
Zeitauflösung	128 ps
Ortsauflösung	0,4 $\mu\text{m}/\text{px}$
Scanmodus	10x0,2 ms/px (bidirektional)
Wellenlänge	850 nm bei NBD-F / 800 nm bei Fluram
Filter	BG 39, IF 530 $\pm$ 20 / IF 460/80
Fläche	$\Delta x$ 80 $\mu\text{m}$ x $\Delta y$ 80 $\mu\text{m}$ (200x200 Pixel)
Objektive	20x bzw. 40x Luftobjektiv, 40x Ölimmersionsobjektiv
Abstand z-Scan	5 $\mu\text{m}$ (wenn nicht anders erwähnt)

### 5.3 3D Imaging von Aminogruppen auf funktionalisierten Keramikröhrchen

Hier gelangen die Aminogruppen nicht durch einen Plasmaprozess auf die Röhrchen und vor allem in das Innere der Porenstruktur, wie es bei den in Kapitel 4 beschriebenen Hohlfasermembranen der Fall ist, sondern das ATPES bzw. AE-APTES als aminogruppenfunktionalisierendes Molekül muss durch Diffusionsprozesse in die Poren vordringen während sich die Röhrchen in einer entsprechenden Reaktionslösung auf einer Rüttelplatte befinden.

Um die Viren gut absorbieren zu können, ist es entscheidend, dass die Aminogruppenfunktionalisierung möglichst weit in das Innere der Membranen hineinreicht und die Aminogruppen homogen verteilt sind.

Diese beiden Parameter lassen sich gut durch fluoreszenzmikroskopische Messungen untersuchen, wenn die Aminogruppen zuvor durch ein geeignetes Labeling (Kapitel 5.2) zur Fluoreszenz anregbar gemacht wurden.

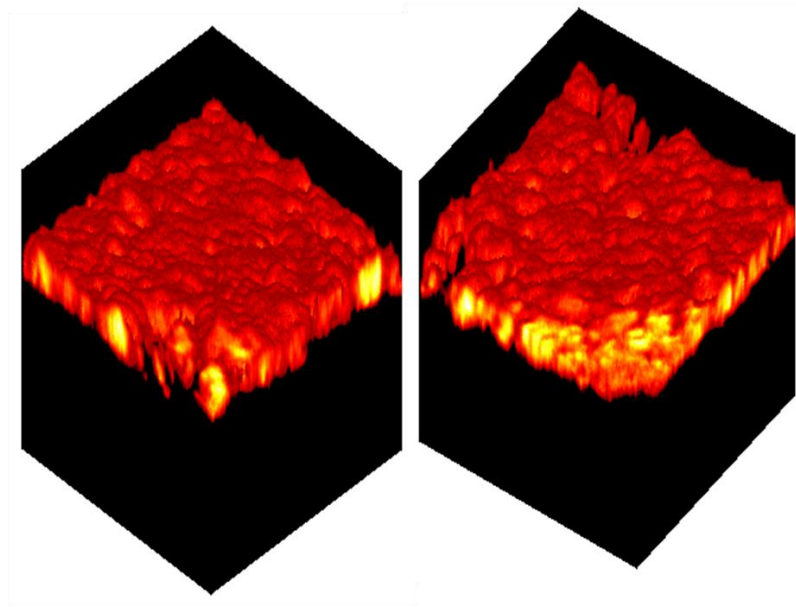
Für die Visualisierung der Aminogruppenverteilung wurden die Proben dreidimensional abgerastert, d.h. sogenannte Tiefenscans aufgenommen. Dies ist vor allem durch die intrinsische Auflösung der ZPM, siehe dazu Kapitel 2.2, möglich, da es nur im direkten Fokalkpunkt zur Anregung kommt. Dabei ist das Auflösungsvermögen zu beachten, welches durch die quadrierte PSF gegeben ist. Nach den Gleichungen 2.15 und 2.16 beträgt das maximale Auflösungsvermögen für das hier angewendete System in etwa 170 nm in lateraler und 210 nm in axialer Richtung und ist damit mehr als ausreichend für die hier zu bestimmenden Größenordnungen.

In Abbildung 5-4 ist exemplarisch ein generiertes 3D Bild der Fluoreszenzintensität im Falschfarbenbild dargestellt. Es wurde wieder die Skala „Red Hot“ in ImageJ verwendet. Die Farbe wechselt mit steigender Intensität von Schwarz über Rot nach Gelb bis hin zu Weiß.

Auf der linken Seite ist die Oberseite des Röhrchens oben, während die rechte Seite die Funktionalisierung von der Unterseite, also aus dem inneren des Wanddurchmessers zeigt.

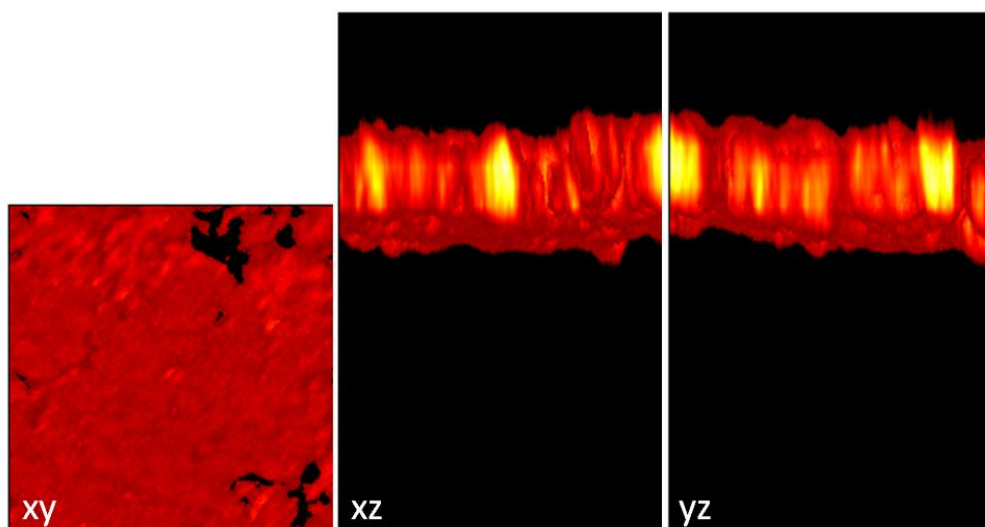
Dabei sind keine Unterschiede zu erkennen, sodass auf eine gleichmäßige Durchdringung des Farbstoffs, bzw. homogene Porenstruktur innerhalb der Membranröhrchen geschlossen werden kann.

In der Oberflächentopographie ist gut zu erkennen, wie rau die Oberfläche ist, da viele Unebenheiten mit zum Teil großem Höhenunterschied zu erkennen sind. Im Vergleich zu den Hohlfasermembranen der Gambro GmbH (Abb. 4-3) ist die Oberflächenrauigkeit hier stärker ausgeprägt. Grund dafür dürfte die geringere Porösität der Keramikröhrchen sein. Denn die hier dargestellte Keramikmembran verfügt über eine durchschnittliche Porengröße von 30 nm, während die der Hohlfasermembrane bei 0,3  $\mu\text{m}$  liegt.



**Abb. 5-4** gerendertes 3D-Bild eines  $135 \times 80 \times 80 \text{ } \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Außenseite eines mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten

An den Seiten des 3D-Bildes ist zu erkennen, dass auch bei den Keramikröhrchen die maximale Intensität, bzw. Aminogruppendichte nicht direkt an der Oberfläche aufzufinden ist, sondern weiter im inneren der Membran. Erklärungen dafür sind in der Interpretation der Messungen an den Hohlfasermembranen in Abschnitt 4.3 nachzulesen. In Abbildung 5-5 sind die zu Abbildung 5-4 dazugehörigen zweidimensionalen Seitenbilder des gerenderten 3D Bildes dargestellt.



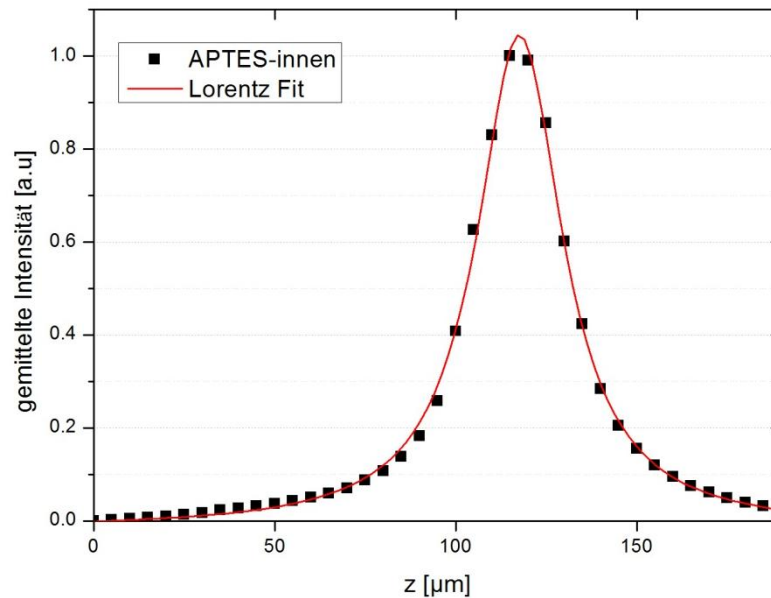
**Abb. 5-5** zweidimensionale Ansichten des z-Scans aus Abbildung 5-4

Hier wird nochmal deutlich, dass die größte Fluoreszenzintensität weiter im Inneren der Membran erreicht wird. In den Bildern für die xz- und yz-Ebene ist die Unebenheit der



Oberfläche ebenfalls gut auszumachen. Auf dem linken Teilbild, welches ein 2D Bild der Oberfläche (xy-Ebene) darstellt, sind schwarze Bereiche zu beobachten in denen keine Fluoreszenzintensität gemessen wurde. An diese Stellen sind bei der Funktionalisierung mit APTES keine Aminogruppen gelangt, oder aber beim Farbstofflabeling kein Farbstoff. Es ist wahrscheinlich, dass es Unterbrechungen in der einheitlichen Porenstruktur gibt und dort größere Hohlräume in der Zirkondioxidmembran vorliegen. Diese Inhomogenitäten sind zum Teil auch schon in den REM Aufnahmen in Abbildung 5-1 zu erkennen.

Um eine Aussage über die tatsächliche Eindringtiefe der Aminogruppen in die Membran treffen zu können, wurden die Intensitäten über die gesamte Fläche eines xy-Bildes integriert und die Werte für jedes Einzelbild in einem Intensitätsprofil gegen die Tiefe (z) aufgetragen. Das Ergebnis ist in Abbildung 5-6 zu sehen.

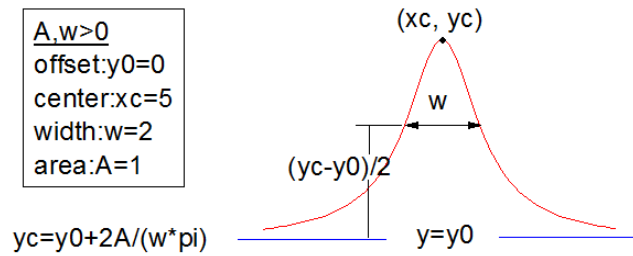


**Abb. 5-6** z-Achsen Intensitätsprofil des gesamten z-Scans eines mit APTES funktionalisierten Membranröhrchens mit dazugehöriger Lorentzfunktionsanpassung

Dabei entspricht jeder schwarze Punkt der gemittelten Intensität des 2D Bildes der entsprechenden Tiefe des Scans. Zur Bestimmung der Schichtdicke der Aminogruppendichte wurde an dieses Profil ein Lorentz Fit nach Gleichung 5.1 angepasst, wobei die Halbwertsbreite  $w$  der ermittelten Schichtdicke entspricht. Dazu wurde das Programm Origin 8 von OriginLab verwendet.

$$y = y_0 + \frac{2A}{\pi} \frac{w}{4(x-x_c)^2 + w^2} \quad (5.1)$$

Die Bedeutung der einzelnen Variablen ist am besten der nachfolgenden Abbildung zu entnehmen.



**Abb. 5-7** Beispielkurve mit Bedeutung der einzelnen Parameter aus Formel 5.1 (übernommen aus Origin 8 von OriginLab)

Die nachfolgende Tabelle zeigt die statistische Auswertung der aus den Fits ermittelten Schichtdicken  $w$  für alle gemessenen Proben bzw. generierten z-Scans.

**Tab. 5.2** Profilbreiten  $w$  aus den nach Lorentz gefitteten z-Scans für mit APTES und AE-APTES funktionalisierte Keramikröhrchen mit Unterscheidung der Aufnahme des z-Scans an der äußeren bzw. inneren Oberfläche, gemittelt über gesamte Scanfläche von  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$

Probe	Profilbreite $w$ [μm]	Fehler Fit [μm]	Mittelwert	STABWN MW
APTES 30 nm aussen				
aussen-1 NBD-F	40,20	1,11	30,64	6,77
aussen-2 NBD-F	25,31	0,50		
aussen-3 NBD-F	26,43	0,90		
aussen-1 Fluram	24,15	2,03	26,65	0,50
aussen-2 Fluram	23,15	2,33		
APTES 30 nm innen				
innen-1 NBD-F	28,89	0,39	30,90	2,01
innen-2 NBD-F	32,90	0,58		
innen-1 Fluram	17,74	2,05		
AE-APTES 30 nm aussen				
aussen-1 NBD-F	30,03	1,36	29,74	1,44
aussen-2 NBD-F	27,85	0,88		
aussen-3 NBD-F	31,33	1,17		
AE-APTES 30 nm innen				
innen-1 NBD-F	33,86	0,71	35,88	1,65
innen-2 NBD-F	37,90	0,97		

Die dazugehörigen z-Scans sind im Anhang unter Abschnitt 9.2 zu finden.

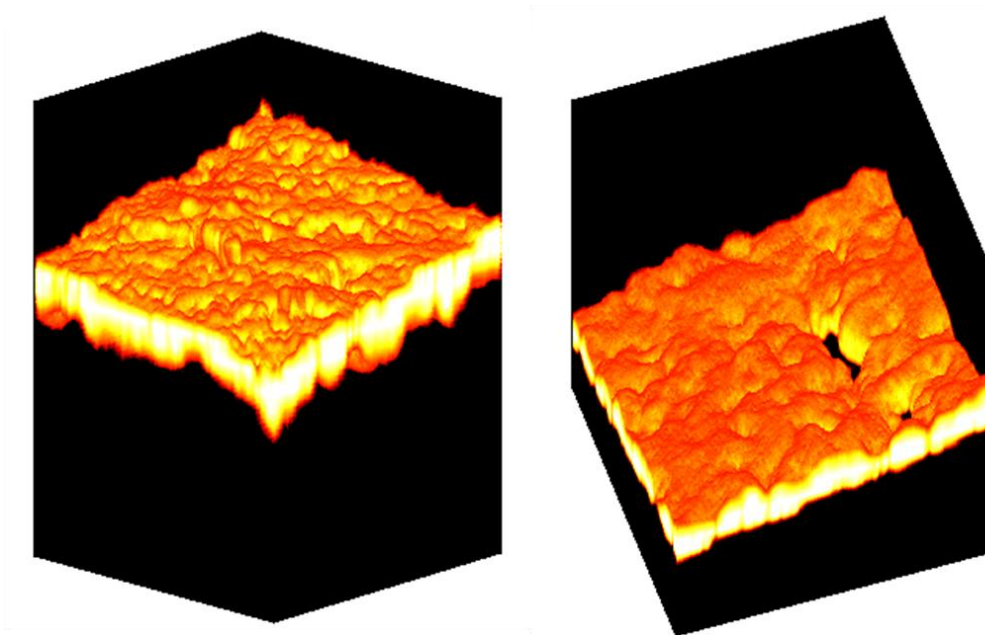
Bei der Untersuchung ging es darum zu testen, ob sich die Schichtdicken für die beiden zur Aminogruppenfunktionalisierung verwendeten Substanzen (APTES und AE-APTES) unterscheiden und ob es zu einer gleichmäßigen Funktionalisierung der äußeren Oberfläche und der inneren Oberfläche kommt, oder ob die Membran vom inneren Durchmesser aus schlechter funktionalisiert wird, da das APTES oder AE-APTES dort nicht so tief eindringen kann, weil es zunächst erst einmal in den Hohlraum des Keramikröhrchens hinein diffundieren muss. Die Porengröße betrug für alle vermessenen Proben 30 nm.

Die mittleren Schichtdicken liegen zwischen 25 und 35  $\mu\text{m}$ , wobei die statistischen Abweichungen zum Teil recht groß sind. Dies ist zum einen bedingt durch die Rauigkeit der Oberfläche, die Höhen und Tiefen aufweist, zum anderen aber bestimmt auch durch eine zu erwartende Varianz in der Eindringtiefe des APTES bzw. AE-APTES. Ein weiterer Grund kann die Mittelung über die gesamte Scanfläche sein. Durch die Rauigkeit der Proben ist es sehr wahrscheinlich, dass bei Mittelung der Intensitätswerte über so einen großen Raum Nebenmaxima mit in die Integration einbezogen werden und so die Profilbreite vergrößern, so dass die in Tabelle 5.2 angegebenen Schichtdicken Obergrenzen entsprechen.

Nach den dort aufgeführten Ergebnissen lassen sich keine starken Unterschiede zwischen der Verwendung von APTES oder AE-APTES feststellen, was auch zu erwarten war, da das AE-APTES lediglich eine weitere Aminogruppe enthält und ansonsten identisch ist zum APTES, also auch den gleichen Platzbedarf hat und genauso tief in die Porenstruktur eindringen sollte wie das APTES. Auch bei den Schichtdicken an der äußeren und inneren Oberfläche des Röhrchens kann kein Unterschied ausgemacht werden.

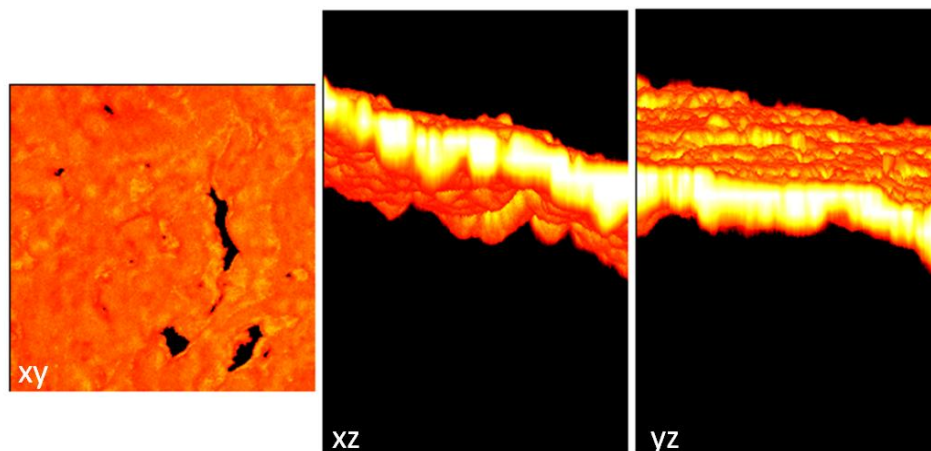
Auffällig ist jedoch die viel geringere Schichtdicke auf der Innenseite bei den mit Fluram gelabelten Keramikröhrchen. Während die ermittelte Schichtdicke für die äußere Oberfläche mit etwa 26  $\mu\text{m}$  noch vergleichbar ist mit der für das NBD-F mit 30  $\mu\text{m}$ , weicht die der inneren Oberfläche mit ca 18  $\mu\text{m}$  deutlich von der mittleren Schichtdicke der mit NBD-F gelabelten Röhrchen ab. Da das Flurammolekül größer ist als das NBD-F wäre es vorstellbar, dass das Flurammolekül Schwierigkeiten hat in den Innendurchmesser der Röhrchen einzudringen, was allerdings nicht sehr wahrscheinlich klingt, da die Proben extra auf einer Rüttelplatte standen während der Labelings um für eine gute Durchmischung zu sorgen und die Diffusion zu unterstützen.

In Abbildung 5-8 ist ein z-Scan eines mit APTES funktionalisierten und mit Fluram gelabelten Keramikröhrchens von der äußeren Oberfläche dargestellt. Vergleicht man dort die Topographie von der oberen Seite (links) mit der der Unterseite des Scans, so fällt auf, dass



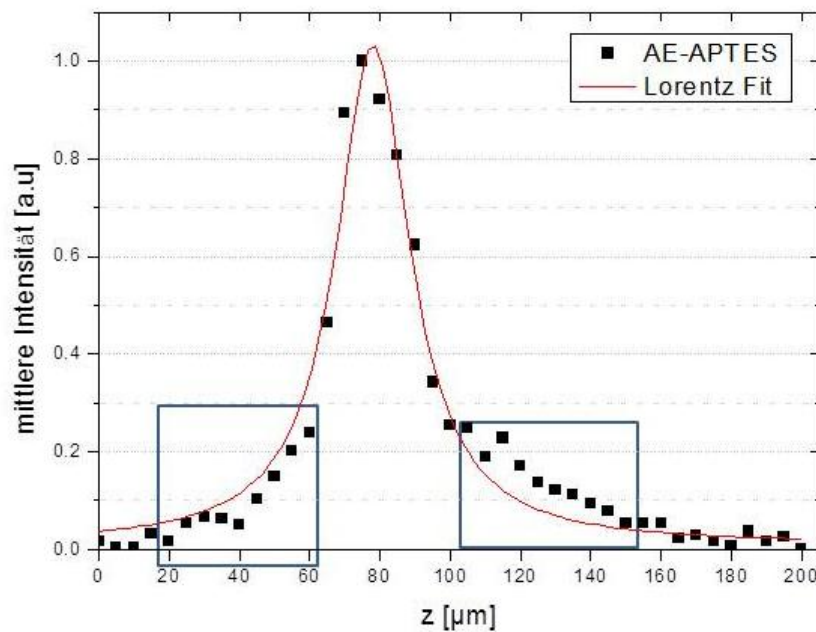
**Abb. 5-8** gerendertes 3D-Bild eines  $120 \times 80 \times 80 \text{ } \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Außenseite eines mit APTES funktionalisierten und mit Fluram gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten

die Oberflächenstruktur an der äußeren Oberfläche kleiner ist als im inneren der Membran. Weitere Bilder sind im Anhang unter Abschnitt 9.2 zu finden. Vorstellbar wäre, dass der Farbstoff mit seiner Größe mit zunehmender Tiefe schwieriger in die gesamte Porenstruktur eindringen kann. Ein Blick auf die Seitenansichten des 3D Bildes in Abbildung 5-9 verdeutlicht außerdem, dass die Oberflächenstruktur auf der Unterseite nicht nur gröber, sondern auch rauer ist, da die Unterschiede im Höhenprofil größer ausgeprägt sind. Dies führt zu einer großen Varianz in der Schichtdicke der Aminogruppenverteilung.



**Abb. 5-9** Seitenansichten zum in Abbildung 5-8 dargestellten z-Scan

Dies fällt allerdings erst auf, wenn man das Intensitätsprofil nicht über die gesamte Scanfläche mittelt, sondern kleinere Ausschnitte wählt. Dadurch werden auch Nebenmaxima im Intensitätsprofil sichtbar, die zu einer Vergrößerung der Schichtdicke führen. In Abbildung 5-10 ist ein solches Intensitätsprofil mit Nebenmaxima über einen kleinen Bereich der Scanfläche ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) dargestellt. In einem Intensitätsprofil über die gesamte Scanfläche von  $80 \times 80 \mu\text{m}^2$  können solche Nebenmaxima (blaue Kästen) nicht mehr einzeln aufgelöst werden, sondern verbreitern das gesamte Profil und täuschen eine tiefere Funktionalisierung vor.



**Abb. 5-10** z-Achsen Intensitätsprofil eines kleinen Ausschnitts ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) eines mit AE-APTES funktionalisierten Membranröhrchens mit störenden Nebenmaxima (blaue Kästen) und dazugehöriger Lorentzfunktionsanpassung

Die Tabelle 5.3 zeigt die Ergebnisse der Lorentzanpassung an die Intensitätsprofile aus den  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  Flächen. Dazu wurden für jeden z-Scan 6 solcher Flächen ausgewählt und dann die Mittelwerte und mittleren Fehler der Profilbreite für jeden Scan (jede Probe) aufgelistet. In den beiden rechten Spalten erfolgt dann die Mittelwertbildung über die mittleren Profilbreiten der zusammengehörigen Proben. Es ist gut zu erkennen, dass die Profilbreiten etwas schmaler geworden sind. Diese Werte sollten nun eher der Realität entsprechen. Noch genauere Ergebnisse würde man erzielen, wenn die Fläche noch kleiner gewählt werden würde, etwa nur einzelne Pixel mit einbeziehen würde.

Zwischen der Funktionalisierung mit APTES bzw. AE-APTES kann weiterhin kein Unterschied ausgemacht werden, auch auf der Aussen- bzw. Innenseite der Membranen scheint die Behandlungstiefe innerhalb der auftretenden Varianzen gleichwertig zu sein. Bei den mit Fluram gelabelten Röhrchen sind nun auch die Schichtdicken auf der Außenseite

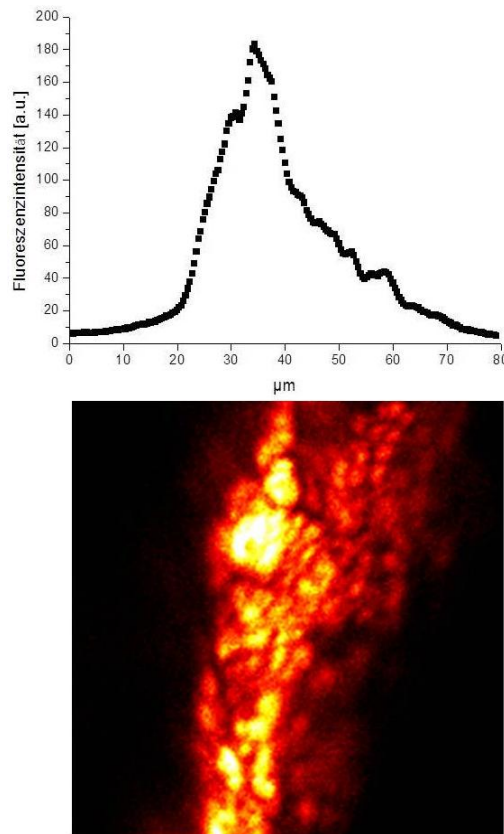
deutlich geringer als beim Labeling mit NBD-F, sie betragen in etwa 10  $\mu\text{m}$ , und liegen nun im gleichen Bereich wie auf der Innenseite.

**Tab. 5.3** Profilbreiten  $\omega$  aus den nach Lorentz gefitteten z-Scans für mit APTES und AE-APTES funktionalisierte Keramikröhrchen mit Unterscheidung der Aufnahme des z-Scans an der äußeren bzw. inneren Oberfläche, gemittelt über einen kleinen Bereich der Scanfläche ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ )

Probe	Profilbreite [μm]	Fehler Fit [μm]	Mittelwert	STABWN MW
APTES 30 nm aussen				
aussen-1 NBD-F	25,29	2,49	26,09	1,20
aussen-2 NBD-F	27,78	2,41		
aussen-3 NBD-F	25,20	1,23		
aussen-1 Fluram	11,38	1,62	10,85	0,53
aussen-2 Fluram	10,33	1,61		
APTES 30 nm innen				
innen-1 NBD-F	24,47	0,68	24,93	0,46
innen-2 NBD-F	25,38	0,61		
innen-1 Fluram	9,24	3,06	9,24	3,06
AE-APTES 30 nm aussen				
aussen-1 NBD-F	26,17	1,47	28,18	3,20
aussen-2 NBD-F	25,67	1,73		
aussen-3 NBD-F	32,70	2,15		
AE-APTES 30 nm innen				
innen-1 NBD-F	21,07	1,44	24,93	3,15
innen-2 NBD-F	28,79	2,74		

Wahrscheinlich ist die hohe Rauigkeit der Fluoreszenzintensität der mit Fluram gelabelten Proben im Inneren der Membran für dieses Verhalten verantwortlich, so dass die Röhrchen besser mit dem kleineren NBD-F gelabelt werden sollten. Dieser liegt von der Molekülgröße näher an der des APTES bzw. AE-APTES und kann deshalb verlässlichere Werte für die Eindringtiefe dieser Substanzen in das Innere der Membranen liefern. Dort wo der Farbstoff nicht hinein diffundieren kann, können auch die beiden Moleküle nicht mehr hinein diffundieren.

In der nachfolgenden Abbildung ist exemplarisch ein aufgenommenes Fluoreszenzintensitätsbild von einem 2D-Scan einer Querschnittsfläche (vgl. Abbildung 4-2) eines mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens mit zugehörigem Profil dargestellt. Die poröse Porenstruktur ist im Fluoreszenzintensitätsbild deutlich zu erkennen.



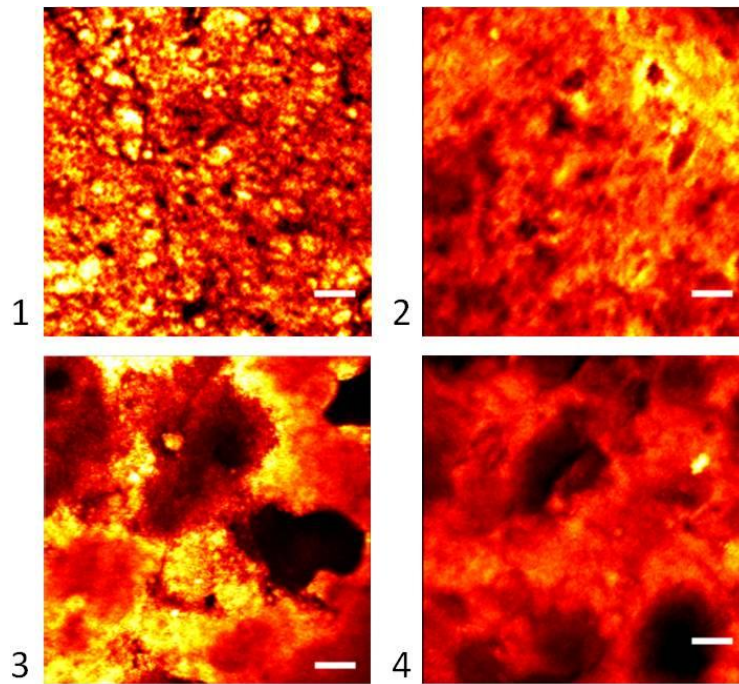
**Abb. 5-11** Querschnittsbild einer mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikmembran (80x80 µm<sup>2</sup>) und dem dazugehörigen Intensitätsprofil

Auch mit der Aufnahme von einzelnen Bildern aus der Querschnittsebene kann ein Einblick in die Behandlungstiefe gewonnen werden. Dies wurde in Kapitel 4.3 am Beispiel der Hohlfasermembrane bereits gezeigt. Bei den hier vermessenen Keramikröhrchen, die in ihrer Größenordnung um ein Vielfaches größer sind, stellt sich die Aufnahme solcher Bilder aber

als schwierig heraus, da der Arbeitsabstand des Objektivs den Abstand zwischen Probe und Objektiv limitiert. Zusammen mit der schlechten Transparenz der Probe unter dem Mikroskop und der Krümmung der Röhrchen ist es schwierig die richtige Probenposition zu finden, um genau in der Mitte der Membran ein Querschnittsbild aufzunehmen. Bei Aufnahme ober- bzw. unterhalb der Mitte beginnt die Krümmung der Membran und der Querschnitt erscheint somit breiter, wodurch auch die Eindringtiefe größer wirkt. Das Intensitätsprofil in Abbildung 5-11 kann beispielsweise nicht mit einer Lorentzianpassung gefittet werden, da der Abfall der Intensität im inneren eher exponentiell, also langsamer abfällt. Auf der dazugehörigen Aufnahme in Falschfarben ist der Grund dafür zu erkennen: die Membran krümmt sich im oberen Teil des Bildes, wodurch sich auch das Profil dementsprechend verbreitert. Durch die für die Mikroskopie eigentlich sehr große Dimension der Probenkörper ist es mit den für die Zweiphotonenanregung notwendigen Objektive mit hoher NA und kleinem Arbeitsabstand fast unmöglich, in den mittleren Bereich der Membran zu gelangen um Messungen aus der Querschnittsebene ohne Einfluss der Krümmung aufzunehmen, so dass bei diesen Probenkörpern die Aufnahme von z-Scans von der Oberfläche der Membran eher zu empfehlen sind. Die Porenstruktur ist allerdings auch in den Querschnittsbildern sehr gut zu erkennen.

Bisher wurden nur Fluoreszenzaufnahmen von Keramikröhrchen mit einer durchschnittlichen Porengröße von 30 nm gezeigt. In der nächsten Abbildung sind Fluoreszenzintensitätsbilder von den Oberflächen der Keramikröhrchen zu sehen. Die oberen gehören zu Röhrchen mit einer durchschnittlichen Porengröße von 30 nm, während die beiden unteren von Röhrchen mit einer durchschnittlichen Porengröße von 90 nm stammen. Dabei werden auf der linken Seite die mit APTES und auf der rechten Seite die mit AE-APTES funktionalisierten Röhrchen gezeigt.





**Abb. 5-12** Fluoreszenzintensitätsbilder von der Oberflächenstruktur der Keramikröhrchen

Bild 1: Porengröße 30 nm, Funktionalisierung mit APTES

Bild 2: Porengröße 30 nm, Funktionalisierung mit AE-APTES

Bild 3: Porengröße 90 nm, Funktionalisierung mit APTES

Bild 4: Porengröße 90 nm, Funktionalisierung mit AE-APTES,  
weißer Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$

Außer der besseren Bildschärfe der Bilder der mit APTES funktionalisierten Keramikröhrchen, unterscheiden sich die Oberflächenstrukturen der APTES funktionalisierten Röhrchen nicht von denen mit AE-APTES funktionalisierten Röhrchen. Dies war auch zu erwarten und wurde etwas weiter oben bereits diskutiert.

Allerdings sind deutliche Unterschiede zwischen den beiden Porengrößen sichtbar. Die beiden unteren Bilder zeigen viel größere, nicht-funktionalisierte Bereiche. Dies könnte auf die allgemein größere Porenstruktur zurückzuführen sein, womit dann auch größere Defektbereiche, bzw. Hohlräume zwischen der ansonsten homogenen Porenstruktur zu erwarten wären.

Da bei der Bestimmung der Schichtdicke der Aminogruppendichte auf den Röhrchen mit größerer Porengröße (90nm) keine signifikanten Unterschiede zu der Schichtdicke bei den Röhrchen mit der kleineren Porengröße (30 nm) festzustellen waren, wird auf einer Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Hier wurden allerdings nur wenige Messungen gemacht, so dass für eine statistisch abgesicherte Aussage hier noch Messbedarf besteht.

Des weiteren wurden Anisotropiemessungen an den „30 nm“ und „90 nm“ Röhrchen durchgeführt, um feststellen zu können, ob die Rotationskorrelationszeiten mit der

Eindringtiefe länger werden, da zu erwarten ist, dass die freie Beweglichkeit der APTES Moleküle mit der Tiefe abnimmt.

Zum anderen sollten die Rotationskorrelationszeiten in der größeren Porenstruktur kürzer sein, da die Moleküle mehr Raum zur Verfügung haben. Erste Messungen ergaben allerdings, dass die Fluoreszenzlebensdauer mit Werten deutlich unter 1 ns zu kurz ist, um Aussagen über den Anisotropiezerfall machen zu können, da dies nur während der Lebensdauer des Fluorophors möglich ist. Denn außerhalb der Lebensdauer des Fluorophors ist kein Messsignal vorhanden.

## 6 Nanopartikel

In dieser Arbeit wird erstmals eine Methode aus der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie angewendet, um die Wechselwirkungen zwischen kleinen organischen Stabilisatormolekülen und der Oberfläche von metalloxidischen Nanopartikeln zu erforschen. Ziel ist es weitere Informationen zu gewinnen, als bisher durch DLS, TGA, NMR Messungen geschehen, oder diese zumindest durch eine weitere unabhängige Methode zu bestätigen.

Dazu wird zunächst die Fluoreszenzlebensdauer des reinen Stabilisatormoleküls in Lösung mit der Fluoreszenzlebensdauer einer stabilisierten Partikeldispersion verglichen. Wirkt sich die Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator auf die Lebensdauer aus, so kann die Lebensdauer als Maß für die Stärke dieser Wechselwirkungen herangezogen werden. Daraus folgend sollte es möglich sein auch die Einflüsse der Kettenlänge, wie auch dessen Konzentration auf die Partikelstabilisierung zu untersuchen.

Die Durchführung von zeitaufgelösten Anisotropiemessungen eröffnet die Möglichkeit zur Bestimmung weiterer Größen, wie die Rotationskorrelationszeit der Stabilisatormoleküle. Diese sollte durch eine Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator in den Partikellösungen deutlich länger sein als in den reinen Stabilisatorlösungen, da der Partikel die Beweglichkeit des Stabilisatormoleküls, an dem das Farbstoffmolekül angekoppelt ist, einschränkt. Mit Hilfe von Anisotropiemessungen könnte es also möglich sein, starke Wechselwirkungen, die die Beweglichkeit der Stabilisatormoleküle einschränken, aufzudecken und zusätzlich einen Hinweis auf die Größe des angebundenen Partikels zu bekommen und somit auch festzustellen, wie homogen die Partikelgrößenverteilung in einer Partikeldispersion ist. Zusätzlich ist es eventuell möglich, die räumliche Anordnung der Stabilisatormoleküle auf der Partikeloberfläche zu untersuchen, die vertikal oder horizontal sein kann.

Das alles sind wichtige Aspekte, die für die Optimierung der Synthese von homogenen Partikeldispersionen zur Anwendung in den verschiedensten Bereichen der Medizin oder Elektrotechnik wichtig sind.

## 6.1 Herstellung und Anwendung

Seit den letzten Jahrzehnten steigt die Bedeutung von Nanopartikeln aus Metalloxiden in der Materialwissenschaft stetig. Die Anwendungsgebiete sind vielfältig. In der Medizintechnik werden wässrige Nanopartikeldispersionen beispielsweise für die Krebsdiagnose, oder neue Behandlungsformen bei denen die Medikamente mit Hilfe von Nanopartikeln durch den Körper transportiert werden eingesetzt.<sup>[LEE2006], [NIE2007], [ITO2005]</sup> Weitere Anwendungsfelder liegen in der Elektrotechnik. So können aus Indium-Arsenid Nanokristallen Licht im IR-Bereich emittierende Dioden (LEDs) produziert werden.<sup>[TES2002]</sup> ITO Nanopartikel dienen zur Herstellung von Solarzellen, Flüssigkristallbildschirmen, organischen Leuchtdioden (oLEDs) und Touchscreens.<sup>[GRO2007]</sup>

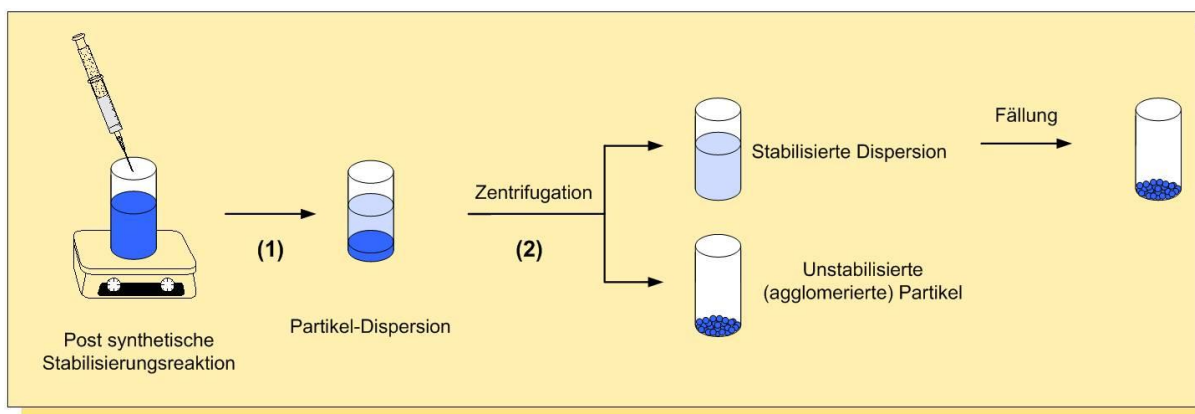
Für die Applikation liegen die Nanopartikel als flüssige Dispersionen vor, da sie so leicht verarbeitet werden können. Dabei ist es wichtig, dass die Nanopartikel nicht in agglomerierter Form vorliegen, da sonst eine homogene Verarbeitung zu hochwertigen Produkten mit exzellenten optischen Eigenschaften nicht möglich ist.<sup>[STU2007]</sup>

Eine verbreitete Methode um Nanopartikel vor der Agglomeration zu schützen, ist die Oberflächenmodifikation, die sich an die eigentliche Partikelsynthese anschließt.<sup>[NEO2008]</sup> Dies kann klassisch durch eine elektrostatische Stabilisierung, wie auch durch eine sterische Stabilisierung durch die Absorption von Polymeren an der Partikeloberfläche erzielt werden. Bei einem neuen Ansatz werden stabilisierte Partikel durch die Absorption kleiner organischer Moleküle, wie z.B. Tenside erhalten.<sup>[BOA2002]</sup>

Am Institut für Partikeltechnik der Technischen Universität Braunschweig werden unter anderem ITO-Nanopartikel und  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikel hergestellt, welche post-synthetisch mit organischen Kleinmolekülen stabilisiert werden.

Für die Synthese der ITO-Nanopartikel wird In(III) Acetylacetonat mit Sn(IV)-*tert*-butoxid in Benzylalkohol bei 200°C für zwei Tage umgesetzt. Die genaue Synthese ist bei Ba et al. (2006) nachzulesen.<sup>[BA2006]</sup>

In Abbildung 6-1 ist der post-synthetische Reaktionsschritt für die Stabilisierung von Metalloxid-Nanopartikeln dargestellt. Man spricht von der nicht-wässrigen Sol-Gel Synthese.



**Abb. 6-1** Nicht-wässrige Sol-Gel Synthese zur Stabilisierung von Metalloxid-Nanopartikeln <sup>[GRO2011]</sup>

Das ITO-Partikelsystem lässt sich mit Hilfe von *n*-Alkylaminen verschieden langer Kettenlänge stabilisieren. Für diese post-synthetische Stabilisierung wird eine bestimmte Menge des *n*-Alkylamins in 5 mL  $\text{CHCl}_3$  gelöst und unter Rühren bei Raumtemperatur zu den Nanopartikeln dazugegeben. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation um die unstabilisierten Partikel von der stabilisierten Dispersion abzutrennen. Für die weitere Analyse werden die stabilisierten Partikel in Methanol gefällt und hinterher getrocknet. <sup>[GRO2012b]</sup> Um für die Fluoreszenzmessungen störende, freie Stabilisatormoleküle aus der Dispersion zu bekommen, werden die Partikel nach der Fällung in Methanol in 5 mL  $\text{CHCl}_3$  gelöst und 1 Stunde gerührt. Anschließend erfolgt die Abtrennung des freien Stabilisators durch erneute Zentrifugation. <sup>[ZELL2013]</sup>

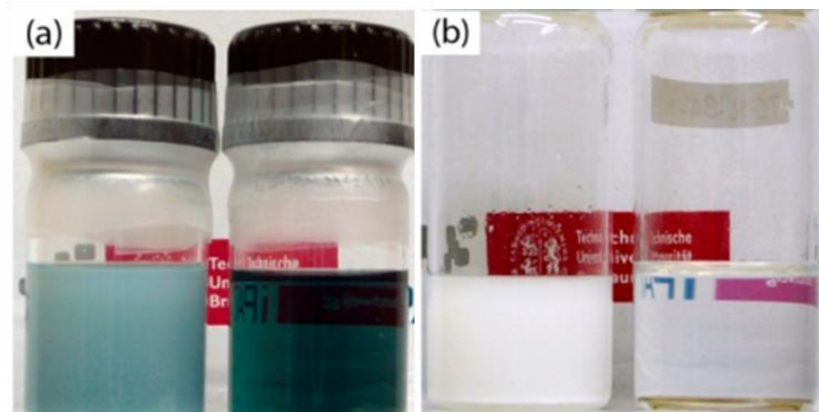
Für die Synthese der  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikel wird  $\text{Zr(IV)}$  *n*-propoxid in Propanol mit Benzylalkohol für 4 Tage bei 220 °C gerührt. <sup>[GROT2012b]</sup> Im Gegensatz zu den ITO-Nanopartikeln erfolgt hier die Stabilisierung mit *n*-Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge, anstelle der *n*-Alkylamine. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden erstmals *n*-Carbonsäuren mit einer endständigen Aminogruppe für die Stabilisierung verwendet, damit diese mit dem Farbstoff NBD-F zur Fluoreszenz gebracht werden können.

Die Art der Wechselwirkung zwischen den organischen Kleinmolekülen und der Partikeloberfläche ist dabei noch nicht vollständig geklärt. So müssen es nicht immer starke Wechselwirkungen zwischen der funktionellen Gruppe des Liganden und der Oberfläche sein, wie bei der Chemisorption, sondern auch schwächere und unspezifischere Wechselwirkungen wie van der Waalsche Kräfte, die mit Energien von 8-40 kJ/mol <sup>[CHA1998]</sup> deutlich schwächer sind als kovalente Bindungen mit 60-800 kJ/mol <sup>[CHA1998]</sup>, können zu stabilen Dispersionen führen. Unter den van der Waalschen Kräften werden allgemein nicht-kovalente Wechselwirkungen zwischen Molekülen oder Atomen verstanden, deren Wechselwirkung stark vom Abstand der wechselwirkenden Partner abhängt, da die Energie

mit der sechsten Potenz des Abstandes abfällt ( $1/r^6$ ).<sup>[ATK1996]</sup> Die van der Waals Kräfte setzen sich aus drei Teilen zusammen. Als erstes seien die Londonschen Dispersionskräfte genannt, die zwischen zwei unpolaren Stoffen bestehen. Weitere Bestandteile sind die Keesom-Kräfte, die zwischen zwei Dipolen entstehen oder auch die Debye-Kräfte, welche zwischen induzierten Dipolen auftreten können.

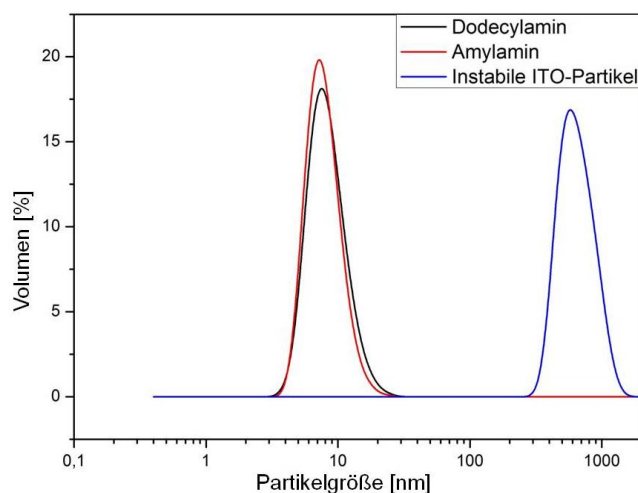
## 6.2 Bisheriger Wissensstand

Aus den bisherigen Untersuchungen des Instituts für Partikeltechnik an den beiden Partikelsystemen geht hervor, dass die Stabilisierung der  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikel aufgrund von kovalenten Bindungen zu den Liganden (*n*-Carbonsäuren) erfolgt, während die Stabilisierung des ITO-Nanopartikelsystems mit deutlich schwächeren Wechselwirkungen, vermutlich von der Waalschen Kräften aus kommt.<sup>[GRO2012b]</sup> Bevor diese Untersuchungen im Folgenden kurz vorgestellt werden, zeigt Abbildung 6-2 zunächst einmal die beiden Partikelsysteme in agglomerierter und stabilisierter Form im Vergleich.



**Abb. 6-2** ITO- und  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsysteme im Vergleich: (a) ITO System vor der Stabilisierung (links) und nach der Stabilisierung (rechts) als transparente Lösung, (b)  $\text{ZrO}_2$  System vor der Stabilisierung (links) und nach der Stabilisierung (rechts) als transparente Lösung<sup>[GRO2012b]</sup>

Die stabilisierten ITO Partikel besitzen laut dynamischer Lichtstreuung (DLS) eine durchschnittliche Größe von 10 nm während die instabilen Partikel Agglomerate im Bereich von 1000 nm bilden (Abbildung 6-3).

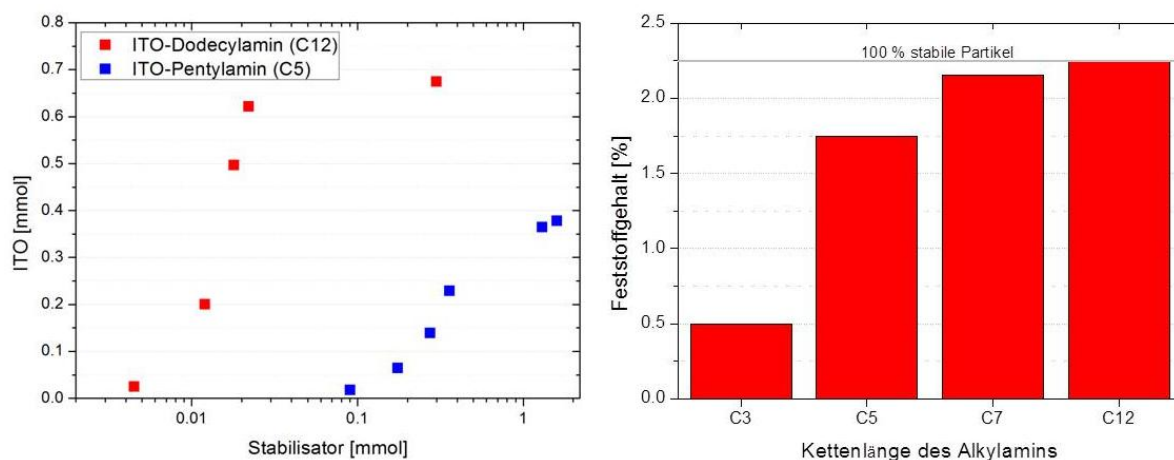


**Abb. 6-3** DLS Messung von mit Dodecylamin (C<sub>12</sub>) und Amylamin (C<sub>3</sub>) stabilisierten ITO Partikeln, sowie von instabilen ITO Partikeln (gemessen am IPAT, Braunschweig)

Mit Hilfe von isothermen titrationskalorimetrischen Messungen (ITC), mit denen Bindungsenthalpien bestimmt werden können, sowie der <sup>1</sup>H-NMR- und <sup>13</sup>C-NMR Spektroskopie mit denen Aussagen über die atomare Umgebung eines Atoms getroffen werden können, wurde herausgefunden, dass sich die Wechselwirkungen zwischen dem Stabilisatormolekül und dem Partikel mit der Kettenlänge des Stabilisatormoleküls ändern. Die genauen Untersuchungen sind bei Grote et al. (2012) zu finden <sup>[GRO2012a], [GRO2012b]</sup>, hier werden nur die wichtigsten Ergebnisse genannt. So wird aus den NMR Untersuchungen geschlossen, dass das Stickstoffatom der Aminogruppe des Stabilisators leicht mit der Partikeloberfläche wechselwirkt. Die Bestimmung der Bindungsenthalpie ( $\Delta H$ ) auf -21 kJ/mol im Falle der Stabilisierung mit Propylamin (C<sub>3</sub>) deutet auf eine schwache Wechselwirkung im Bereich der van der Waalschen Kräfte hin. Mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisatormoleküls sinkt  $\Delta H$  - im Falle des Dodecylamins (C<sub>12</sub>) beträgt es nur noch -10 kJ/mol.

Es wird postuliert, dass die Stabilisierung mit kurzkettigen Aminen vorrangig über spezifische Wechselwirkungen des Stickstoffatoms mit der Partikeloberfläche erfolgt, während es bei der Stabilisierung mit längerkettigen Aminen zu einer unspezifischeren van der Waalschen Wechselwirkung kommt, in der die gesamte Alkylkette mit der Partikeloberfläche wechselwirkt. <sup>[GRO2012a]</sup> Die Kettenlänge des Stabilisators, wie auch deren Konzentration haben großen Einfluss auf die Stabilisierung. Generell ist zu sagen, dass beim ITO-System höhere Stabilisatorkonzentrationen erforderlich sind als bei dem ZrO<sub>2</sub>-System, welches durch kovalente Bindungen zum Stabilisatormolekül stabilisiert wird. Je kürzer die Alkylkette des stabilisierenden Amins, desto mehr Stabilisatormoleküle sind erforderlich um die Partikel-

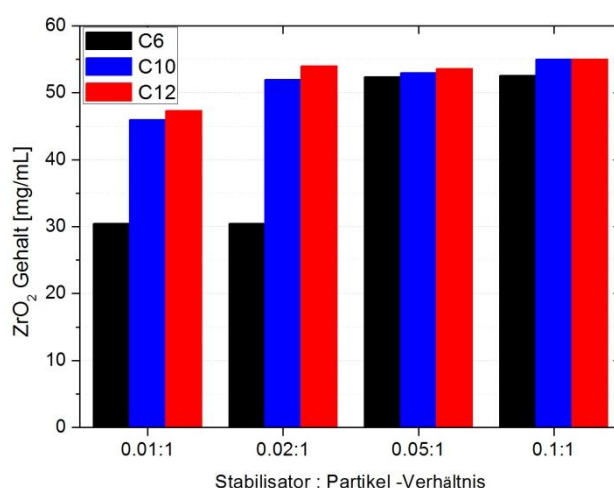
dispersion zu stabilisieren. Am meisten stabilisierte Partikel pro Ansatz werden mit den langkettigen Stabilisatormolekülen erzielt (Abbildung 6-4).



**Abb. 6-4** Abhängigkeit der Stabilisatorkonzentration auf die Menge an stabilisierten Partikeln für ITO Dispersionen in  $\text{CHCl}_3$  (links) und Einfluss der Kettenlänge des Stabilisators auf den Feststoffgehalt der ITO-Dispersionen (nach: [GRO2012a])

Insgesamt kann beim ITO-System etwa ein Drittel der angesetzten Partikelmenge stabilisiert werden, da die Liganden den Benzylalkohol aus der Partikelsynthese nicht vollständig von der Partikeloberfläche verdrängen können.<sup>[GRO2012a]</sup>

Im Gegensatz dazu steht das  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem. Hier können die Partikelansätze vollständig stabilisiert werden. Der Benzylalkohol wird von den Stabilisatormolekülen restlos von der Partikeloberfläche verdrängt und es gibt kaum Abhängigkeiten der Stabilisatorkonzentration und Stabilisatorkettenlänge auf die Menge an stabilisierten Partikeln, wie Abbildung 6-5 zeigt.<sup>[GRO2012b]</sup>



**Abb. 6-5** Einfluss der Kettenlänge (C6, C10 und C12) und des eingesetzten molaren Verhältnisses zwischen Stabilisator und Metalloxid (nach: [GRO2012b])



Die Carboxylgruppe des Stabilisatormoleküls bindet selektiv und kovalent an das Zirkoniumzentrum auf der Partikeloberfläche. Dies wird durch die Untersuchungen mittels  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR Spektroskopie von Grote et al. (2012) gezeigt.<sup>[GRO2012b]</sup>

Beide Partikelsysteme unterscheiden sich stark hinsichtlich der Stärke und Art der Wechselwirkung zwischen den Stabilisatormolekülen und der Partikeloberfläche.

Die Ergebnisse der Messungen dazu werden in Kapitel 6.4 gezeigt und diskutiert.

### 6.3 Labeling Nanopartikel

Die Nanopartikeldispersionen wurden vom Projektpartner, dem Institut für Partikeltechnik, an der Technischen Universität Braunschweig hergestellt. Das Herstellungsverfahren und die Stabilisierung der Dispersionen sind in Kapitel 6.1 beschrieben worden. Hier wird auf das Labelingverfahren und die Probenvorbereitung eingegangen.

Da es bei den Messungen darum geht, Unterschiede zwischen einer Vergleichslösung und einer Partikelprobe festzustellen um daraus Wechselwirkungen des Stabilisators mit der Partikeloberfläche abzuleiten, müssen andere Einflussfaktoren auf das Fluoreszenzverhalten, zu dem das Quenchen gehört (siehe Kapitel 2.3), ausgeschlossen werden. Aus diesem Grund wurden Verdünnungsreihen erstellt und vermessen. So kann ein Fluoreszenzquenching aufgrund zu hoher Partikel- oder Stabilisatormoleküle erkannt und in die Interpretation der Messergebnisse mit einbezogen werden.

Bei dieser Untersuchungsmethode wurde immer jeweils eine Lösung mit dem reinen Stabilisator in Lösung gelabelt. Diese entspricht der Vergleichslösung. In der gleichen Art und Weise wurden stabilisierte Partikeldispersionen verschiedener Chargen gelabelt. Die Konzentration des Stabilisators in der Vergleichslösung entsprach dabei der Stabilisatorkonzentration des Partikelansatzes.

Die Proben wurden in mehreren Schritten verdünnt, bevor der gelöste Farbstoff zu den Lösungen hinzu gegeben wurde. Dabei wurde immer mit dem Lösungsmittel verdünnt, in dem die Partikel auch dispergiert waren. Als Farbstoff diente das NBD-F, welches immer in dem Lösungsmittel gelöst wurde, in dem die Proben stabilisiert wurden. Dabei betrug die Konzentration der Farbstofflösung 0,1 mmol/L, bevor sie zu den Dispersionen hinzugefügt wurde. Anschließend wurden die Proben lichtdicht verschlossen und auf eine Rüttelplatte gestellt. Nach 40 Minuten ist die Labelingprozedur abgeschlossen und die Proben können am Fluoreszenzmikroskop vermessen werden. Da die Farbstofflösung hier im Gegensatz zu dem

Verfahren bei der Fluoreszenzmarkierung der Hohlfasermembrane oder Keramikröhrchen in der zu vermessenden Lösung bleiben, ist es wichtig, dass der Farbstoff im starken Überschuss zu den Aminen dazu gegeben wird, denn überschüssiger Farbstoff kann nicht abgewaschen werden. Zusätzlich sollte die Konzentration des Farbstoffs unterhalb der Schwelle sein, ab der sich die Farbstoffmoleküle selbst quenchen (self-Quenching).

Es wurden Partikelchargen mit unterschiedlichen Stabilisator/Partikel-Verhältnissen vermessen. Die sich daraus ergebenden Fluoreszenzprobenzusammensetzungen sind für einige Beispiele in den folgenden Tabellen dargestellt.

Tabelle 6.1 zeigt die Probenzusammensetzung des ITO Partikelsystems in einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1. Die Angaben gelten für die Stabilisierung mit *n*-Alkylaminen und die Stabilisierung mit Diaminen.

**Tab. 6.1** Probenzusammensetzung des ITO Partikelsystems im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1

Probe	Verdünnung	N NBD-F:Stabi	c Partikel [mmol/L]	c Stabilisator [mmol/L]	c NBD-F [mmol/L]
S	-	1:12761	116,01	116,01	0,01
1:1	1:1	1:1276	63,81	63,81	0,05
1:3	1:3	1:850	42,54	42,54	0,05
1:4	1:4	1:638	31,9	31,9	0,05
1:5	1:5	1:510	25,52	25,52	0,05
1:10	1:10	1:255	12,76	12,76	0,05
1:20	1:20	1:127	6,38	6,38	0,05
1:30	1:30	1:85	4,25	4,25	0,05

Die Tabelle 6.2 zeigt die Probenzusammensetzung des ITO Partikelsystems für das Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1.

**Tab. 6.2** Probenzusammensetzung des ITO Partikelsystems im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1

Probe	Verdünnung	N NBD-F:Stabi	c Partikel [mmol/L]	c Stabilisator [mmol/L]	c NBD-F [mmol/L]
S	-	1:12761	116,01	58	0,01
1:1	1:1	1:1276	63,81	31,9	0,025
1:3	1:3	1:850	42,54	21,27	0,025
1:4	1:4	1:638	31,9	15,95	0,025
1:5	1:5	1:510	25,52	12,76	0,025

In Tabelle 6.3 wird die Probenzusammensetzung des ZrO<sub>2</sub> Partikelsystems aufgelistet. Im Gegensatz zum ITO System werden die Partikel hier nicht mit Alkylaminen oder Diaminen, sondern mit Aminocarbonsäuren stabilisiert.

**Tab. 6.3** Probenzusammensetzung des  $\text{ZrO}_2$  Partikelsystems im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1

Probe	Verdünnung	N NBD-F:Stabi	c Partikel [mol/L]	c Stabilisator [mol/L]	c NBD-F [mmol/L]
S	-	1:7630	1,9	0,076	0,01
1:1	1:1	1:763	0,95	0,038	0,05
1:3	1:3	1:508	0,6375	0,0255	0,05
1:4	1:4	1:380	0,475	0,019	0,05
1:5	1:5	1:152	0,1875	0,0075	0,05

Dabei bezieht sich das Verhältnis zwischen Stabilisator zu Partikel nicht direkt auf die Molekülanzahl, sondern auf die Anzahl der Metalloxideinheiten im Ansatz der Partikelsynthese. Hieraus lässt sich jedoch berechnen, wie viele Stabilisatormoleküle in einer Dispersion letztendlich auf einen Partikel kommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6.4 dargestellt.

**Tab. 6.4** Anzahl der Stabilisatormoleküle pro Partikel

Stabilisator/Partikel Verhältnis	Stabilisatormoleküle pro Partikel
<b>ITO Systeme</b>	
1:1	8600
0,5:1	4300
<b>ZrO<sub>2</sub> Systeme</b>	
1:1	1800
0,5:1	900
0,2:1	360
0,1:1	180
0,02:1	35

Die angegebenen Werte beziehen sich immer auf die verwendeten Mengen im Synthesansatz. Da die Ausbeute aber nicht 100% betrifft und auch von Charge zu Charge schwanken kann, sind dies nur Anhaltspunkte.

Die verwendeten Lösungsmittel wurden entweder von Acros oder Sigma-Aldrich bezogen und entsprachen entweder der HPLC-Reinheit, oder der p.a.-Reinheit. Restliches Wasser ist mit Hilfe von Natriumsulfat entfernt worden.

Zur Anwendung kamen Ethanol (EtOH), Butanol (BuOH), Hexanol (HexOH), Decanol (DecOH) und Chloroform ( $\text{CHCl}_3$ ).

Als Farbstoff für die Erzeugung der Fluoreszenz in den Proben wurde 4-Fluoro-7-nitrobenzofurazan (NBD-F) verwendet. Der Farbstoff wurde von Sigma-Aldrich bezogen.

In Tabelle 6.5 sind die verwendeten Messparameter angegeben.

**Tab. 6.5** Messparameter für die Anisotropiemessungen an Nanopartikeln

Parameter	Einstellung
Zeitauflösung	4 ps
Art der Messung	Punktmessung
Wellenlänge	850 nm
Filter	BG 39, IF 530 $\pm$ 20
Objektive	Zeiss EC Plan-Neofluar 40x, NA 1.30, Ölimmersion

Da hier nicht nur Fluoreszenzintensitäten bestimmt werden, sondern zeitaufgelöste Größen, wie die Fluoreszenzlebensdauer oder der Anisotropiezerfall, ist hier eine deutlich geringere Zeitauflösung gewählt als in den vorherigen Abschnitten.

## 6.4 Anisotropiemessungen an ITO-Nanopartikeln

In diesem Kapitel werden die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer- und Anisotropiemessungen der stabilisierten Metalloxidnanopartikel vorgestellt.

Es folgen zunächst die Untersuchungen am ITO-Partikelsystem, welches mit *n*-Alkylaminen und Diaminen stabilisiert wurde. Anschließend werden die Ergebnisse des ZrO<sub>2</sub>-Partikelsystems vorgestellt, welches mit Aminocarbonsäuren stabilisiert wurde.

### 6.4.1 *n*-Alkylamine

Bevor auf den nächsten Seiten die Ergebnisse der einzelnen Messreihen zur Stabilisierung der ITO-Partikel mittels *n*-Alkylamine präsentiert werden, soll an dieser Stelle zunächst noch auf ein paar wichtige Vorüberlegungen und dementsprechende Voruntersuchungen hingewiesen werden.

Da die Stabilisierung der Partikel zum Teil über die Aminogruppe des Stabilisators abläuft und der verwendete Farbstoff NBD-F ebenfalls mit dieser Aminogruppe reagiert, um sein

fluoreszierendes Produkt zu bilden, kann es sein, dass der Zusatz des Farbstoffes die Stabilisierung des Partikelsystems verschlechtert. Der Farbstoff wurde zwar stets nur im großen Überschuss zu den Partikelproben dazugegeben (siehe Kapitel 6.3), so dass immer gewährleistet war, dass, falls es zu einem Ablösen der Stabilisatormoleküle von der Partikeloberfläche kommt, nur sehr wenige Stabilisatormoleküle davon betroffen sein würden und die Partikel somit nicht Ausfallen dürften. Zudem hätte die Lebensdauer bei einem kompletten Ablösen der mit Farbstoff gelabelten Stabilisatormoleküle der Lebensdauer der gelabelten Stabilisatormoleküle in der partikelfreien Vergleichslösung entsprechen müssen, was nicht der Fall war (siehe folgende Ergebnisse der Messreihen), so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Stabilisatormoleküle trotz dieser Konkurrenzsituation nicht von der Partikeloberfläche abgelöst werden.

Um diesen Sachverhalt aber letztendlich zu klären, wurden Tests durchgeführt, in denen der Farbstoff in großem Überschuss zu den stabilisierten Partikeln hinzu gegeben wurde. Es kam dabei, ausgenommen die Stabilisierung mit Amylamin, zu keinem Ausfall der Partikel. Dies deutet darauf hin, dass die Wechselwirkung zwischen Stabilisator und Partikel, welche die Partikel stabilisiert, auch nach Zugabe des Farbstoffes noch bestehen bleibt. Der Farbstoff ist in der Lage mit primären und sekundären Aminen zu reagieren und dann zu fluoreszieren. Er löst dabei ein Wasserstoffatom von der Aminogruppe. Hier liegt also eine gewisse Konkurrenzreaktion zwischen Partikel-Stabilisator Interaktion und Stabilisator-Farbstoff-Reaktion vor. Diese Konkurrenzsituation führt aber zu keinem Ausfall der Partikel, so dass im Fall der Stabilisierung über *n*-Alkylamine angenommen werden kann, dass der Farbstoff ein Wasserstoffatom der Aminogruppe für seine Reaktion verwendet (Abspaltung von HF) und das andere Wasserstoffatom der Aminogruppe weiterhin mit der Partikeloberfläche wechselwirken kann, oder aber, dass die Wechselwirkung der Alkylkette ausreicht, um die Partikel stabil zu halten. In Tabelle 6.6 sind die Ergebnisse dieser Voruntersuchungen dargestellt.

**Tab. 6.6** Stabilität der mit *n*-Alkylaminen stabilisierten ITO-Partikel bei Farbstoffüberschuss (AA – Amylamin, PA-Pentylamin, HA – Heptylamin, OA – Octylamin, DDA - Dodecylamin)

Stabilisator	AA	PA	HA	OA	DDA
stabile Partikel	×	✓	✓	✓	✓

Der Stabilisator Amylamin nimmt hier eine Art Sonderstellung ein. Als Stabilisator mit der kürzesten Alkylkette sind hier die Partikel nach Zugabe des Farbstoffes im Überschuss ausgefallen. Diese Tatsache alleine würde den Verdacht erhärten, dass die Wechselwirkung zwischen der Aminogruppe des Stabilisators und der Partikeloberfläche durch den Farbstoff stark abgeschwächt wird und die Partikel bei den längerkettigen Stabilisatoren nur deshalb nicht ausfallen, da dort die Wechselwirkung der Alkylkette mit der Partikeloberfläche ausreicht, um das System stabil zu halten. Amylamin hat diese lange Alkylkette nicht. Allerdings sind die mit Amylamin stabilisierten Partikelproben auch sehr häufig bereits bei der bloßen Verdünnung mit Chloroform ausgefallen. Dies deutet dann eher auf eine generell schlechte Stabilisierung dieses Partikelsystems hin und wird auch durch die Ergebnisse von IPAT bestätigt (Kapitel 6.2, Abbildung 6-4).

Es lässt sich also festhalten, dass durch die Voruntersuchungen geklärt werden konnte, dass die Reaktion des Farbstoffs mit einem Wasserstoffatom aus der Aminogruppe des Stabilisators die Partikel-Stabilisator Wechselwirkung nicht nennenswert abschwächt, sowie dass die Wechselwirkung des Amylamins an der Partikeloberfläche sehr schwach ist und Partikelsysteme mit diesem Stabilisator deshalb leicht destabilisiert werden.

### **Fluoreszenzlebensdauer**

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen für die verschiedenen Stabilisatorkettenlängen und die verschiedenen Stabilisator/Partikel-Verhältnisse gezeigt und erläutert.

Dabei werden immer die Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenzlebensdauern für die verschiedenen Dispersionsverdünnungen eines Stabilisator/Partikel-Verhältnisses mit ihren statistischen Abweichungen vom Mittelwert angegeben (siehe Kapitel 3.5), da dieser Fehler größer ist als die Fehler aus den einzelnen Fits. Somit kann nicht nur ein Unterschied zwischen Vergleichslösung und Partikellösung in der Fluoreszenzlebensdauer aufgedeckt werden, sondern sogleich auch der Einfluss der Dispersionsverdünnung auf die Fluoreszenzlebensdauer ermittelt werden. Die erhaltenen Messwerte sind in den Abbildungen nur zu einer besseren Sichtbarkeit durch Linien miteinander verbunden worden. Der Verlauf dieser Linien kann nicht als lückenloser, tatsächlicher Verlauf der Messwerte angesehen werden.

Für alle mit NBD-F gelabelten *n*-Alkylamine ist der Fluoreszenzzerfall monoexponentiell.

### Amylamin (C<sub>3</sub>)

In Abbildung 6.6 sind die Fluoreszenzlebensdauern für die Amylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1 zu sehen.

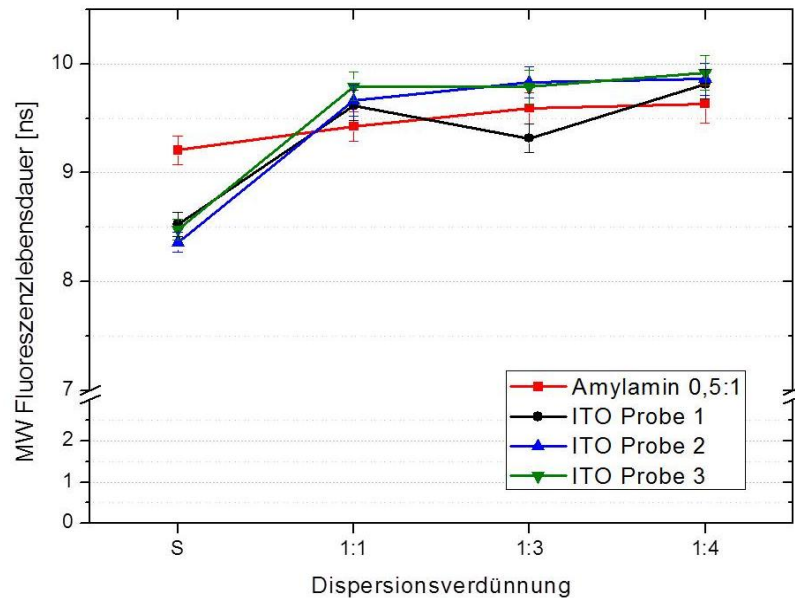


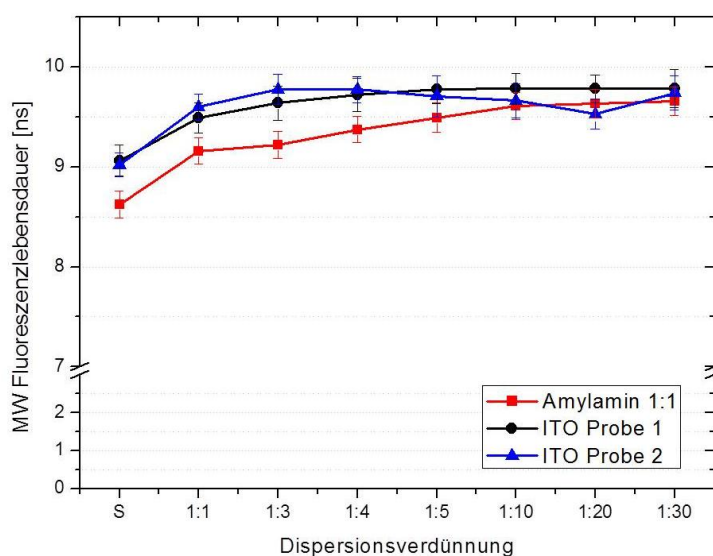
Abb. 6-6 Amylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1

Von diesem Messsystem wurden drei unterschiedliche ITO-Partikelchargen (Probe 1-3 in Abb. 6.6) vermessen. Dabei zeigt sich nur eine geringe Varianz zwischen den Chargen. Lediglich Dispersionsverdünnung 1:3 von Probe 1 weicht von einem ansonsten einheitlichen Fluoreszenzverhalten der Chargen ab.

Alle Fluoreszenzlebensdauern, auch die der partikkelosen Vergleichslösung, liegen grob in einem Bereich von 8,5 ns bis 10 ns und unterscheiden sich somit nicht sehr stark voneinander. Es sind aber dennoch kleine Unterschiede zwischen der Lebensdauer des reinen Stabilisators ( $\tau_{\text{Stabi}}$ ) und der Lebensdauer der stabilisierten Partikelprobe ( $\tau_{\text{ITO}}$ ) auszumachen, die auch bei Betrachtung der Messunsicherheit und des statistischen Fehlers bestehen bleiben. Es scheint also eine schwache Wechselwirkung zwischen Amylamin und der Partikeloberfläche zu geben. Am größten ist die Differenz der Lebensdauer zwischen Partikel- und Vergleichslösung in der unverdünnten Dispersion (S). Allgemein lässt sich für jede vermessene Probe festhalten, dass die Lebensdauer leicht mit der Dispersionsverdünnung ansteigt. Eventuell ist die Anfangskonzentration der Partikel zu hoch, so dass es zum Quenchen (siehe Kapitel 2.3) der Fluoreszenz kommt. Um solche Phänomene (Einflüsse auf die Fluoreszenz) erkennen und in die Interpretation der Ergebnisse einbeziehen zu können, wurde immer in mehreren Dispersionsverdünnungen gemessen.

Eine weitere interessante und für die Interpretation der Partikel-Stabilisator Wechselwirkungen wichtig werdende Beobachtung, die während der Herstellung der Messreihen gemacht wurde, soll hier nicht unerwähnt bleiben: dieses Partikelsystem scheint nicht so stabil zu sein, wie die Partikelsysteme mit länger-kettigen Stabilisatoren. Die Partikel fielen oftmals bereits bei der Zugabe von  $\text{CHCl}_3$  aus. Die Lösung war dann nicht mehr transparent, sondern wurde leicht trüb, dies bereits vor der Zugabe von NBD-F.

In der nächsten Abbildung sind die Ergebnisse für die Stabilisierung mit Amylamin im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 dargestellt.



**Abb. 6-7** Amylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1

Hier wurden zwei Partikelchargen untersucht. Bis auf die Dispersionsverdünnung 1:20 von Charge 2 zeigen die beiden Chargen auch wieder einen sehr ähnlichen Verlauf in der Fluoreszenzlebensdauer. Die Lebensdauer ist in den Partikelproben im Vergleich zur Vergleichslösung etwas länger. Daraus lässt sich schließen, dass der angeregte Zustand in den Partikelproben leicht stabilisiert und der strahlungslose Zerfall etwas gehemmt wird. Der Unterschied in der Lebensdauer zwischen Vergleichs- und Partikelproben wird ab der Dispersionsverdünnung 1:10 etwas kleiner, da sich die Kurven annähern. Dies wäre ein Hinweis darauf, dass die Stabilisierung in Amylamin mit Zunahme der Verdünnung etwas schwächer wird. Man kann vermuten, dass an dieser Stelle zu viel Lösungsmittel dazu gegeben wurde und die Stabilisierung somit gestört wurde. Einige Partikel könnten langsam anfangen auszufallen und die Fluoreszenzlebensdauer der entsprechenden Stabilisatoren sinkt auf die in freier Lösung ab. Vermutlich gibt es einen bestimmten Konzentrationsbereich, in



dem die Partikel gut stabilisiert sind, eine weitere Verdünnung verschlechtert die Stabilisierung.

Auffällig ist außerdem die deutlich kürzere Lebensdauer der Stabilisatorlösung im unverdünnten Zustand (S) im Vergleich zu der entsprechenden im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1 (siehe Abb. 6.6). Hier liegt die Lebensdauer etwa bei 8,6 ns, während sie in dem geringeren Verhältnis bei 9,2 ns liegt. Mit zunehmender Verdünnung gleichen sich die Lebensdauern auf einen konstanten Wert von ~9,5 ns an. Es scheint also wirklich zu Beginn ein Fluoreszenzquenching (bereits bei Stabilisator/Partikelverhältnis 0,5:1) zu geben, da die Konzentration des Amylamins zu hoch ist. Gleiches scheint auch in den Partikelproben vorzuliegen, nur das dort auch eine zu hohe Partikelkonzentration für das Quenchen verantwortlich sein kann. Denn die Partikelproben werden nach der Stabilisierung noch gewaschen, um überschüssigen freien Stabilisator zu entfernen (siehe Kapitel 6.1). Dabei werden natürlich immer auch ein paar Stabilisatormoleküle wieder von der Partikeloberfläche gelöst und mit ausgewaschen. So sollte die Stabilisatorkonzentration in den Partikelproben immer unterhalb derer in den Vergleichslösungen liegen (im Abschnitt über die Stabilisierung mit Dodecylamin wird dies genauer untersucht).

Abgesehen von der unverdünnten Dispersion (S) sind die Fluoreszenzlebensdauern der beiden Stabilisator/Partikel-Verhältnisse 0,5:1 und 1:1 für Amylamin als Stabilisator vergleichbar. Dabei ist zu beachten, dass die Messungen beim Verhältnis 0,5:1 nur bis zu einer Dispersionsverdünnung von 1:5 durchgeführt wurden. In diesem Bereich sind die Ergebnisse aber sehr ähnlich, so dass an dieser Stelle kein Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnis auf die Art der Wechselwirkung des Stabilisators mit der Partikeloberfläche durch die Fluoreszenzlebensdauermessungen erkannt werden kann.

Als nächstes werden die Ergebnisse der Messungen mit der nächstlängeren Alkylkette im Stabilisatormolekül (Heptylamin) gezeigt.

### **Heptylamin (C<sub>7</sub>)**

Abbildung 6-8 zeigt die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern zweier ITO-Partikelchargen, die mit Heptylamin in einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,5:1 stabilisiert worden sind.

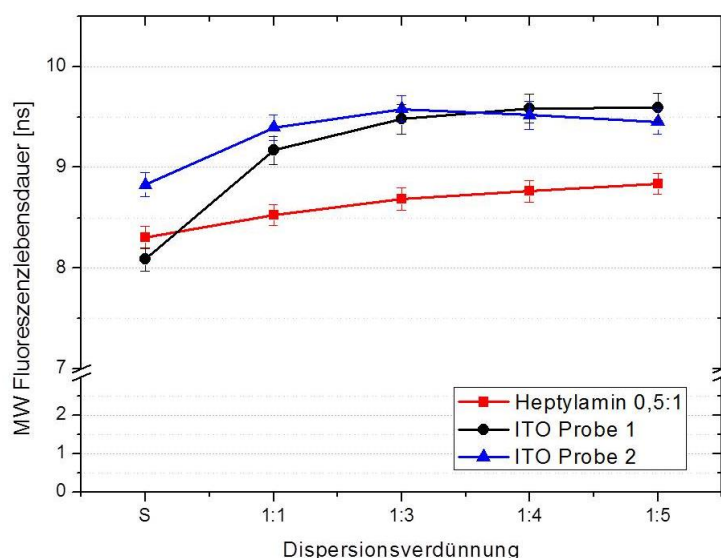


Abb. 6-8 Heptylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1

Auch hier zeigt sich, wie bei Amylamin, nur eine geringe Varianz zwischen den beiden Partikelchargen (Probe 1 und 2). Lediglich die unverdünnte Dispersion (S) von Charge 1 zeigt eine Abweichung zu einer deutlich niedrigeren Lebensdauer (ca. 8 ns im Vergleich zu ca. 9 ns). Vielleicht ist die Stabilisator- oder Partikelkonzentration in dieser Charge höher als in der anderen und so kommt es in der noch unverdünnten Dispersion zu einem Energietransfer zwischen weiteren Stabilisatormolekülen oder Partikeln mit dem angeregten Zustand des Farbstoffs (Quenching). Dies gleicht sich dann aber mit Beginn der Verdünnung aus, da sich die Lebensdauern von Charge 1 dann immer weiter denen von Charge 2 angleichen.

Generell liegen hier die Lebensdauern der Partikelproben wieder oberhalb derer in der reinen Stabilisatorlösung. Es kann also davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung des Stabilisators mit der Partikeloberfläche zu einer Stabilisierung des angeregten Zustands der NBD-Gruppe führt. Dies wird bei der Stabilisierung mit Heptylamin deutlicher als bei Amylamin, da hier die Differenz von  $\tau_{\text{Stabi}}$  zu  $\tau_{\text{ITO}}$  größer ist. Dies könnte ein erstes Zeichen sein, dass die Fluoreszenzlebensdaueremessungen die Vermutung des Instituts für Partikeltechnik bestätigen, dass die Stabilisierung mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators besser wird. So haben Grote et al. (2012) heraus gefunden, dass mit zunehmender Kettenlänge des Stabilisators immer weniger Stabilisator erforderlich ist, um die Partikel zu stabilisieren und mehr stabile Partikel erhalten werden (Kapitel 6.2, Abbildung 6-4, sowie für genaueres [GRO2012a]). Nicht nur, dass die Differenz in  $\tau$  größer ist von C<sub>3</sub> auf C<sub>7</sub> (Stabilisatorkettenlänge), so gleichen sich die Lebensdauern mit Zunahme der Dispersionsverdünnung auch nicht wieder etwas mehr an, sondern bleiben über den gesamten Konzentrationsbereich konstant. Die Wechselwirkungen zwischen Stabilisator und

Partikeloberfläche scheinen bei Heptylamin stärker, oder etwas andere zu sein. Allgemein machten die Proben hier einen stabileren Eindruck, da bei der Probenvorbereitung keine Partikelprobe bereits vorzeitig ausgefallen ist. Alle Proben sind transparent geblieben.

Als nächstes wird auf die Messungen der mit Heptylamin stabilisierten ITO-Partikel im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 eingegangen (Abbildung 6-9).

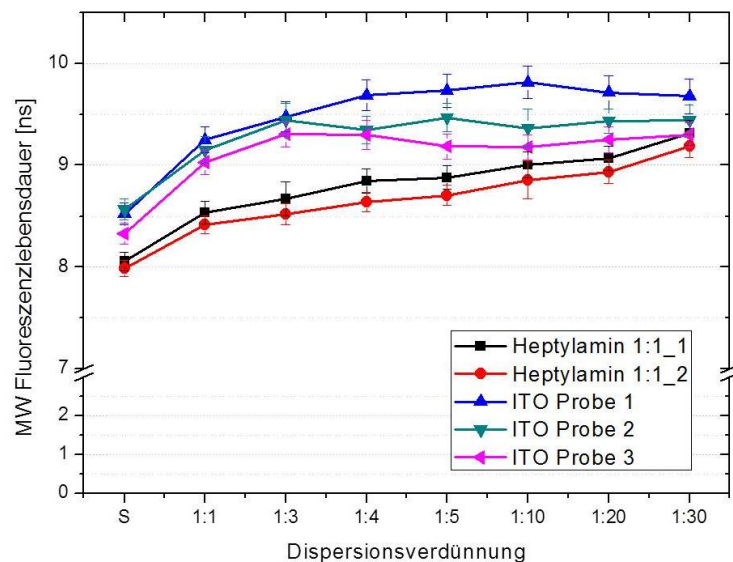


Abb. 6-9 Heptylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1

Hier tritt die Besonderheit auf, dass zunächst nur eine Stabilisatorlösung (Heptylamin 1:1\_1) und eine Partikelprobe (ITO Probe 1) untersucht wurden und dann 6 Monate später erneut eine Stabilisatorlösung und zwei Partikelchargen vermessen wurden, um auch hier eine statistische Sicherheit zu erlangen. Die Messreihen der beiden Stabilisatorlösungen stimmen sehr gut überein, sie zeigen den exakt gleichen Verlauf, wenn Lösung 1 auch auf einem leicht erhöhten Level liegt. Die Partikelprobe 1 zeigt die größte Differenz in der Lebensdauer zu den gelabelten Stabilisatorlösungen. In allen Lösungen steigt die Lebensdauer mit Zunahme der Dispersionsverdünnung zunächst wieder an, welches erneut einen Hinweis auf Fluoreszenzquenching im höheren Konzentrationsbereich liefert. Dies wird besonders deutlich, wenn man den Verlauf der Stabilisatorlösung bis zu einer Dispersionsverdünnung von 1:5 mit dem Verlauf der Stabilisatorlösung aus dem geringeren Stabilisator/Partikel-Verhältnis (0,5:1) aus Abbildung 6-8 vergleicht. Der Verlauf ist eigentlich identisch, bis auf in der unverdünnten Dispersion (S). Dort ist die Lebensdauer für das Verhältnis 0,5:1 bei 8,3 ns und in dem Verhältnis 1:1 mit 8 ns geringfügig kürzer. Dies gleicht sich aber aus. Bei der Dispersionsverdünnung 1:5 haben beide Verhältnisse die gleiche Lebensdauer (8,7 ns). Dies sind zwar nur kleine Unterschiede, dürfen aber als signifikant angesehen werden. In der

Ausgangslösung des Verhältnisses 1:1 ist die Stabilisatorkonzentration doppelt so hoch wie in dem Verhältnis 0,5:1. Anscheinend ist die absolute Konzentration an Heptylamin im Verhältnis 1:1 gerade etwas zu hoch, um keine Anfälligkeit für Fluoreszenzquenching zu haben. In niedrigem Konzentrationsbereichen, in denen keine Quenchingprozesse stattfinden, sollte die Fluoreszenzlebensdauer konzentrationsunabhängig sein.

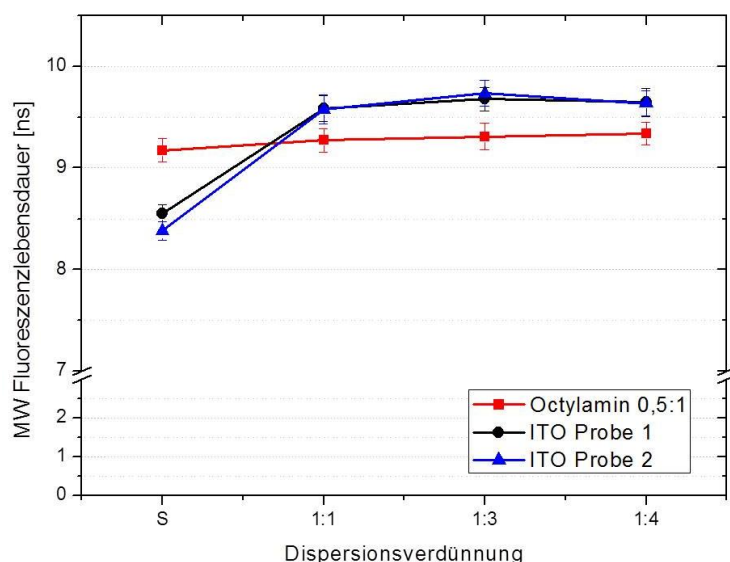
Die Partikelchargen 2 und 3 zeigen einen sehr ähnlichen Verlauf der Fluoreszenzlebensdauern über die gesamten Dispersionsverdünnungen. Die Varianz zweier Chargen, die zeitlich nah aufeinander folgend hergestellt worden sind, ist also sehr gering. Bis zu der Dispersionsverdünnung 1:4 verlaufen diese auch sehr ähnlich zu Charge 1, die etwa 6 Monate vorher gemessen und hergestellt wurde. Danach steigt die Lebensdauer nicht weiter leicht an, wie in Charge 1, sondern bleibt konstant auf einem kürzeren Niveau, bzw. sinkt ein wenig. Bei der Dispersionsverdünnung 1:30 am Ende ist ihre Lebensdauer nicht mehr von der der Stabilisatorlösungen zu unterscheiden. Die Lösungen sind auch leicht trübe geworden. Die beiden später hergestellten Chargen sind in ihrem Fluoreszenzverhalten sehr ähnlich, unterschieden sich aber mit Zunahme der Verdünnung von Charge 1. Die Chargen 2 und 3 sind nicht so gut stabilisiert wie Charge 1, evtl. weicht ihr Herstellungsprozess leicht ab.

Vergleicht man den Verlauf der Fluoreszenzlebensdauern für die beiden Stabilisator/Partikel-Verhältnisse 0,5:1 (Abb. 6-8) und 1:1 (Abbildung 6-9), so ist kein signifikanter Unterschied erkennbar. Es wird also kein Unterschied der beiden Verhältnisse in den Fluoreszenzlebensdauern erkannt und somit kann durch die Fluoreszenzlebensdauermessungen keine Abhängigkeit des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses auf die Stabilisierung der Partikel gefunden werden.

Als nächstes folgen die Ergebnisse für die mit Octylamin ( $C_8$ ) stabilisierten ITO-Nanopartikel.

### **Octylamin ( $C_8$ )**

In Abbildung 6-10 sind die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern für die beiden vermessenen Partikelchargen (1 und 2) und die Stabilisatorlösung als Vergleich gegen die Dispersionsverdünnung aufgetragen. Zunächst wieder für das Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1.



**Abb. 6-10** Octylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1

Betrachtet man den Verlauf der Lebensdauern für die beiden Partikelchargen, so verlaufen diese fast identisch und zeigen nur eine sehr geringe Varianz. Ihre Lebensdauern liegen in den Dispersionsverdünnungen 1:1, 1:3 und 1:4 mit 9,6-9,7 ns auf einem konstanten Niveau. Nur die unverdünnte Anfangsdispersion (S) weist wieder eine deutlich niedrigere Lebensdauer auf (~8,5 ns). Gründe dafür, wie z.B. das Quenchen der Fluoreszenz, wurden bereits in den vorangegangenen Abschnitten genannt und in Kapitel 2.3 erklärt. Die Fluoreszenzlebensdauer der reinen Stabilisatorlösung verläuft innerhalb der Dispersionsverdünnung sehr konstant und ist nur minimal steigend zu längeren Lebensdauern. Auch bei Octylamin als Stabilisator ist eine Differenz der Lebensdauer zwischen Partikel- und Stabilisatorlösung zu erkennen, welche auf eine Wechselwirkung der Stabilisatormoleküle mit der Partikeloberfläche hindeutet.

Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer der mit Octylamin stabilisierten ITO-Partikel im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 sind im Anhang zu finden (Kapitel 9.3). Der Verlauf der Lebensdauern ist sehr ähnlich zu den voran gegangenen, bereits gezeigten Messungen, denn auch hier ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Lebensdauern des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses 0,5:1 und 1:1 zu sehen. Was bedeutet, dass durch die Bestimmung der Fluoreszenzlebensdauer bisher kein Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses auf die Stabilisierung zu erkennen ist.

Um einen möglichen Einfluss der Kettenlänge auf die Stabilisierung des ITO Partikelsystems durch die Fluoreszenzlebensdauer-messungen, wie er sich beim Vergleich der Ergebnisse für Amylamin und Heptylamin angedeutet hat, evtl. bestätigen zu können, werden die Ergebnisse

für die Stabilisierung mit Dodecylamin ( $C_{12}$ ) als Stabilisator mit der längsten Alkylkette im Folgenden aber noch gezeigt und diskutiert.

### Dodecylamin ( $C_{12}$ )

Zunächst wieder die Ergebnisse für das Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1 (Abbildung 6-11) dargestellt.

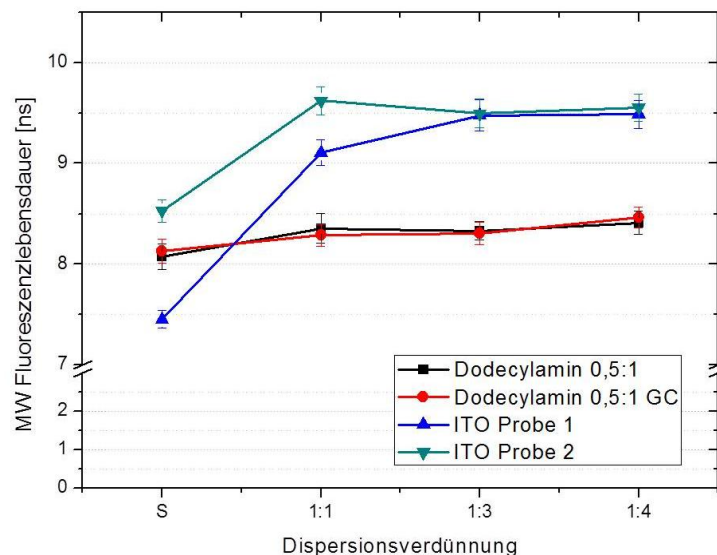


Abb. 6-11 Dodecylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,5:1

Wie bereits im Abschnitt Amylamin ( $C_3$ ) erwähnt wurde, ist die Konzentration an Stabilisatormolekülen in der reinen Stabilisatorlösung immer etwas höher als in den Partikelproben, auch wenn zu Beginn der Partikelstabilisierung die gleiche Menge an Stabilisator hinzu gegeben wurde, wie in der reinen Stabilisatorlösung. Dies liegt einfach daran, dass nach der Stabilisierung eine Redispergierung mit anschließender Zentrifugation erfolgt, um die nicht mit der Partikeloberfläche wechselwirkenden Stabilisatormoleküle wieder aus der Lösung zu entfernen (Kapitel 6.1). Denn diese Stabilisatormoleküle würden im Labelingprozess auch mit einer NBD-Gruppe zu einem Fluorophor verknüpft werden und würden in der Partikellösung eine Lebensdauer, ähnlich wie in der reinen Stabilisatorlösung, erzeugen. Aus diesem Grund ist die Stabilisatorkonzentration in den Partikellösungen geringer und sollte nur noch wechselwirkende Stabilisatormoleküle enthalten. Um zu quantifizieren, wie viele Stabilisatormoleküle bei der Redispergierung und Zentrifugation verloren gehen, hat das Institut für Partikeltechnik die Überstandslösung gaschromatographisch untersuchen lassen. Dabei wurde bestimmt, dass 70 % der eingesetzten Stabilisatormoleküle nach dem Redispergieren noch an der Partikeloberfläche vorhanden sind.<sup>[ZEL2014b]</sup> Um sicher zu gehen, dass diese unterschiedlichen

Stabilisatorkonzentrationen keinen Einfluss auf den Verlauf der Fluoreszenzlebensdauern in den hier gezeigten Messungen für die reine Stabilisatorlösung haben, und nicht zu einer falschen Interpretation der Partikel-Wechselwirkungen führen, wurde am Beispiel des Dodecylamins eine „normale“ Stabilisatorlösung (mit den Stabilisatormengen wie zu Beginn der Partikelstabilisierung) mit einer an die GC Ergebnisse angepassten Stabilisatorlösung in ihrem Fluoreszenzverhalten verglichen. Abbildung 6-11 zeigt diese beiden Messreihen. Die Fluoreszenzlebensdauern beider Reihen sind fast identisch, es ist kein signifikanter Unterschied feststellbar. Es ist also vernachlässigbar, dass die Konzentration der reinen Stabilisatorlösung nicht exakt der Konzentration der Stabilisatormoleküle in den Partikelproben entspricht. Die Fluoreszenzlebensdauer ist in einem weiten Konzentrationsbereich konzentrationsunabhängig, da sie nicht von der Fluoreszenzintensität abhängt. Es dürfen aber keine störenden Einflüsse, wie z.B: Stöße mit Quenchemolekülen, auftreten.

Bei der Stabilisierung mit Dodecylamin ist der gemessene Unterschied zwischen  $\tau_{ITO}$  und  $\tau_{Stabi}$  bisher am größten. Beide Partikelchargen zeigen auch wieder einen übereinstimmenden Verlauf mit nur geringer Varianz, lässt man die Lebensdauer für die Anfangsdispersion wieder außen vor. In Charge 1 könnten wieder etwas mehr stabilisierte Partikel vorliegen, die an einem Energietransfer mit dem angeregten Zustand der NBD-Gruppe beteiligt sind und z.B. durch Kollisionen dessen Lebensdauer verkürzen. Die Differenz zwischen  $\tau_{ITO}$  und  $\tau_{Stabi}$  wird mit Zunahme der Dispersionsverdünnung etwas größer und deutet somit evtl. auf eine stärkere Stabilisierung in den verdünnteren Dispersionen hin. Oder aber die störenden Effekte, die die Lebensdauer beeinflussen, nehmen einfach nur mit Abnahme der Konzentration an Partikeln und Stabilisator ab. Die Konzentration an Farbstoff ist von Dispersion 1:1 bis 1:30 immer die gleiche (siehe Kapitel 6.3). Dann dürfte man nur die Fluoreszenzlebensdauern für die Interpretation einer möglichen Stabilisator-Partikel Wechselwirkung in Betracht ziehen, die sehr stark verdünnt sind. Allerdings hat dort teilweise die Problematik vor, dass die Partikel bei starker Verdünnung nicht mehr stabil sind (Amylamin).

Um das Bild zu vervollständigen, werden in Abbildung 6-12 die Ergebnisse der Stabilisierung mit Dodecylamin im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 gezeigt.

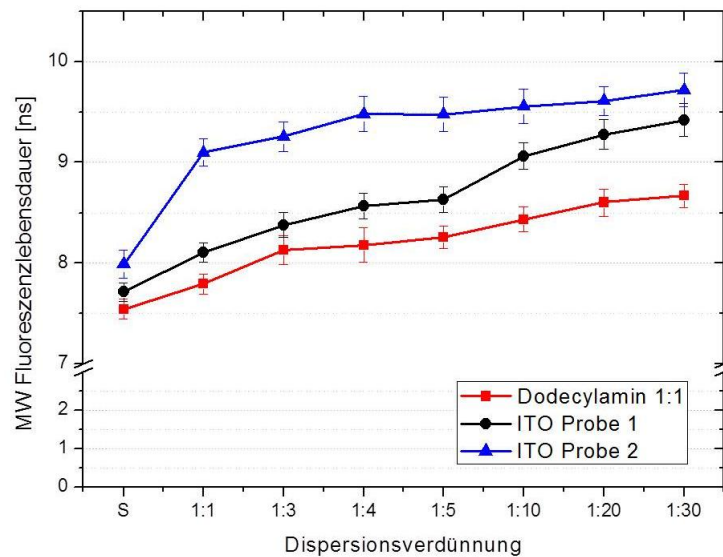


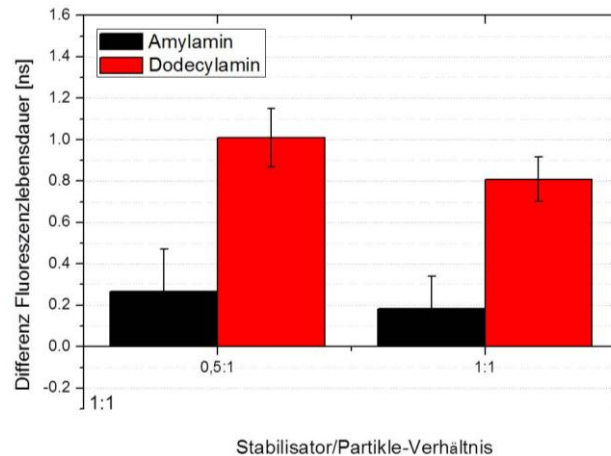
Abb. 6-12 Dodecylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1

Die Fluoreszenzlebensdauern der beiden gemessenen Partikelchargen unterscheiden sich diesmal stärker voneinander. Beide lassen sich aber von der reinen Stabilisatorlösung unterscheiden. Charge 2 hat in der unverdünnten Anfangslösung wieder eine recht kurze Lebensdauer (ca. 8 ns), steigt dann aber in der ersten Dispersionsverdünnung bereits auf über 9 ns und bis zur Dispersionsverdünnung 1:30 noch leicht weiter auf bis zu 9,7 ns an. Charge 1 startet bei etwa 7,7 ns und steigt dann ganz allmählich von Dispersionverdünnung zu Dispersionsverdünnung an, bis bei Dispersionsverdünnung 1:30 schließlich 9,5 ns für die Lebensdauer bestimmt werden.

### Einfluss Kettenlänge des Stabilisators und des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses

In Abbildung 6-13 sind die Differenzen in der Fluoreszenzlebensdauer zwischen Stabilisator und Partikellösung für die beiden Stabilisator/Partikel-Verhältnisse 0,5:1 und 1:1 dargestellt. Dabei werden die Stabilisierungen mit Amylamin und Dodecylamin bei einer Dispersionsverdünnung von 1:1 gegenüber gestellt.

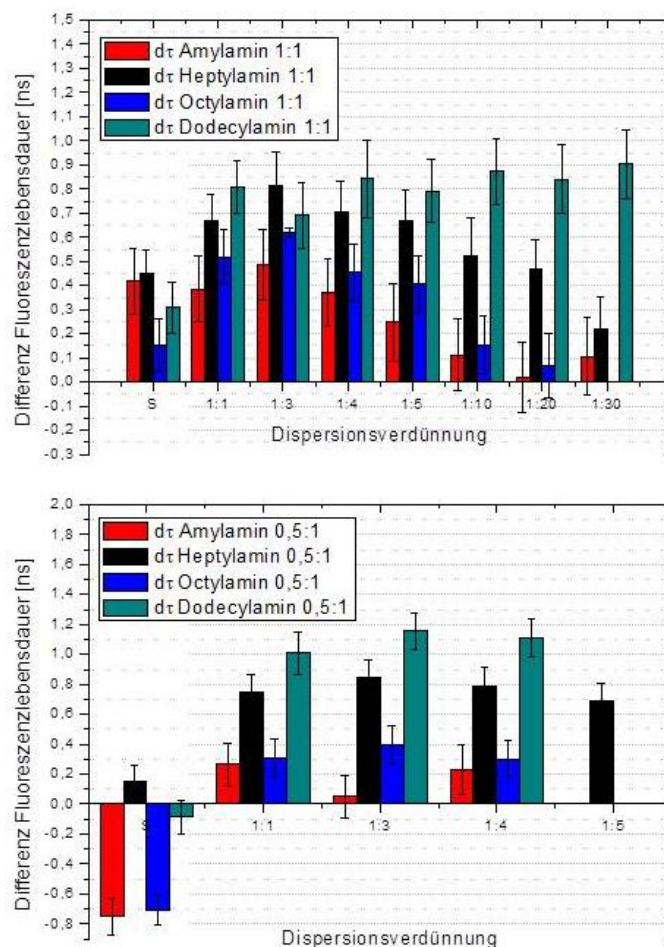




**Abb. 6-13** Vergleich der Stabilisator/Partikel-Verhältnisse bei der Dispersionsverdünnung 1:1

Es ist kein großer Unterschied zwischen den Molverhältnissen 0,5:1 und 1:1 feststellbar, aber die Kettenlänge scheint einen Einfluss auf die Stabilisierung zu haben. Je länger die Kette des Stabilisators, desto stabiler werden die Partikeldispersionen, da die Unterschiede in den Lebensdauern zunehmen und auch noch bei großer Dispersionsverdünnung bestehen bleiben.

Um den möglichen Einfluss der Kettenlänge des Stabilisators auf die Stabilisierung der Partikel, der durch die Fluoreszenzlebensdauer messungen zugänglich wird, noch einmal deutlicher zu zeigen, sind in Abbildung 6-14 nur die Mittelwerte der Differenzen der Lebensdauern zwischen den Partikelchargen und ihren Stabilisatorlösungen gegen die Dispersionsverdünnung aufgetragen. Diesmal sind beide Stabilisator/Partikel-Verhältnisse zur besseren Vergleichbarkeit in einer Abbildung dargestellt. Oben die Darstellung für das Verhältnis 1:1 und unten für das Verhältnis 0,5:1.



**Abb. 6-14** Differenzen der Fluoreszenzlebensdauern zwischen Stabilisator- und Partikellösungen

Die Fehlerbalken entsprechen dem mittleren Fehler der Absolutwerte. Die Differenzen für die Ausgangsdispersion S werden für die folgende Interpretation nicht berücksichtigt, da diese, wie in den voran gegangenen Abschnitten bereits diskutiert wurde, durch diverse störende Begleiteffekte beeinflusst werden. Betrachtet man nun die beiden Stabilisator/Partikel-Verhältnisse, so erkennt man einen ähnlichen Verlauf, wie auch schon in Abb. 6-13 für Dispersionsverdünnung 1:1 und den Stabilisator mit der kürzesten und der längsten Alkylkette dargestellt. Die Messungen der Fluoreszenzlebensdauer zeigen also keinen Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses auf die Partikelstabilisierung an. Da die Bestimmung der Lebensdauer intensitätsunabhängig ist, ist dies auch nachzuvollziehen. Die Art der Wechselwirkung müsste sich schon mit Änderung des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses ändern, um zu deutlichen Änderungen in der Lebensdauer zu führen. Sind in einem bestimmten Verhältnis nur eine größere Anzahl von Partikeln stabil, so sollte dies die Lebensdauer nicht ändern, es sei denn die Konzentration nimmt so stark zu, dass Quenching-Effekte eine Rolle spielen. Über die Menge an stabilen Partikeln in den Dispersionen kann also über die Lebensdauer keine direkte Angabe gemacht werden. Dazu hätte man die

Fluoreszenzintensität genauer untersuchen und das System kalibrieren müssen, um darüber Aussagen machen zu können. Grote et al. (2012) geben an, dass bei einer langen Stabilisatorkette (z.B: Dodecylamin) bereits bei einem geringen Stabilisator/Partikel-Verhältnis eine vergleichbare Anzahl an stabilen Partikeln vorliegt, als z.B.: bei Amylamin bei einem deutlich höheren Stabilisator/Partikel-Verhältnis.<sup>[GRO2012a]</sup>

In dieser Arbeit sollte aber hauptsächlich die Art und Stärke der Wechselwirkung zwischen Stabilisatormolekül und Partikeloberfläche untersucht werden. Dazu sind Fluoreszenzlebensdauermessungen, die eine Aussage über die Umgebung des Fluorophores machen, sowie Anisotropiemessungen, die im nächsten Abschnitt behandelt werden, geeignet, da sie mehr Aussagen zulassen als einfache Intensitätsmessungen.

Die Differenzen in der Lebensdauer zwischen Stabilisator- und Partikellösungen in Abbildung 6-14 sind generell nicht sehr stark ausgeprägt. Die Partikelproben sind aber statistisch klar von der Stabilisatorlösung zu unterscheiden. Bei Amylamin beträgt die Differenz im Mittel ca. 0,4 ns, während sie bei Dodecylamin im Mittel auf 1,0 - 1,2 ns anwächst. Heptylamin, das mit seiner Kettenlänge genau zwischen Amylamin und Dodecylamin einzuordnen ist, passt mit einer mittleren Fluoreszenzlebensdauerdifferenz von meist 0,7 - 0,8 ns gut in die Mitte der beiden anderen genannten Stabilisatoren. Nun wäre zu erwarten, dass Octylamin, welches nur eine CH<sub>2</sub>-Gruppe mehr besitzt, ebenso gut in diese Reihe passt und nur eine geringfügig höhere, wenn nicht vergleichbare Differenz aufzeigt. Dies ist aber nicht der Fall. Octylamin weist zwar mit Differenzen von 0,4-0,6 ns in den meisten Dispersionsverdünnungen größere Differenzen auf als Amylamin, liegt aber unterhalb der Differenzen für Heptylamin und Dodecylamin. Vernachlässigt man das leicht abweichende Verhalten von Octylamin, so kann man die Behauptung aufstellen, dass sich die Differenz der Lebensdauer mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators erhöht. Dies könnte so interpretiert werden, dass die Wechselwirkungen des Stabilisators mit der Partikeloberfläche mit Zunahme der Kettenlänge stärker werden.

Schaut man sich in Abbildung 6-14 den Verlauf der Lebensdauerdifferenzen der einzelnen Stabilisatormoleküle mit Änderung der Dispersionsverdünnung an, so ist ein Trend zu erkennen. Bei kurzer Kettenlänge des Stabilisators werden die größten Lebensdauerdifferenzen in den niedrigen Dispersionsverdünnungen (bei den höheren Konzentrationen) erreicht. Bei Amylamin sind die Partikel durch eine fortlaufende Verdünnung ja teilweise sogar ausgefallen, was bereits in vorangegangenen Abschnitten erwähnt wurde. Je länger die Kette (Octylamin wieder ausgenommen), desto weiter verschiebt sich das Maximum der Lebensdauerdifferenz zu höheren Dispersionsverdünnungen (niedrige

Konzentrationen). Mit weiterer Verdünnung verschiebt sich auch die auf das Maximum folgende Abnahme der Differenz zu höheren Dispersionsverdünnungen. Bei Dodecylamin kommt es sogar zu keinem Abfall der Differenz bis zur größten, vermessenen Dispersionsverdünnung von 1:30. Dodecylamin zeigt ab der Dispersionsverdünnung 1:1 bis zum Ende eine relativ konstante Differenz von 0,9 ns (bei Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1). Man kann also annehmen, dass jeder Stabilisator einen bestimmten Konzentrationsbereich aufweist, in dem er gut stabilisiert. Wie groß dieser Bereich ist, hängt von der Kettenlänge des Stabilisators ab. Dodecylamin hat im gesamten, vermessenen Konzentrationsbereich gut stabilisiert, während Amylamin am schwächsten stabilisiert hat.

### **Zusammenfassung Fluoreszenzlebensdauer**

Aufgrund der Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen gibt es eine schwache Wechselwirkung der Stabilisatoren mit der Partikeloberfläche. Diese nimmt mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators zu. Die Partikel, die mit langkettigen Stabilisatoren stabilisiert sind, sind auch bei Verdünnung der Dispersionen weiterhin stabil. Ein Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses auf die Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator kann durch reine Lebensdauermessungen ohne genaue Betrachtung der Fluoreszenzintensitäten bei geeichten Messbedingungen nicht bestimmt werden (siehe oben). Die gemachten Annahmen sind jedoch nur korrekt, wenn die Konzentration der Partikel und Stabilisatormoleküle in den vermessenen Dispersionsverdünnungen gering genug ist, dass keine störenden Effekte auf die Fluoreszenzlebensdauer ausgeübt werden, wie Energietransfer durch Kollisionen mit Quenchern und Wechselwirkungen mit dem angeregten Zustand der NBD-Gruppe. Die Konzentrationen innerhalb der Dispersionsverdünnungen sind im Kapitel 6.2 tabellarisch zusammengefasst. Die Farbstoffkonzentration liegt mit 0,05 bzw. 0,025 mmol/L unterhalb Grenze von 1 mmol/L, ab derer der Abstand zwischen den Fluorophoren klein genug wird, um ein sogenanntes self-quenching hervorzurufen (Kapitel 2.3).

Bisher stimmen die Ergebnisse aus den Fluoreszenzmessungen gut mit den postulierten Annahmen der Arbeitsgruppe Garnweitner (Kapitel 6.2) überein, dass die Wechselwirkung der Stabilisatormoleküle mit der Partikeloberfläche nur über schwache Van der Waals Wechselwirkungen verläuft. Zusätzlich beschreiben sie, dass bei Amylamin die Wechselwirkung hauptsächlich über das Stickstoffatom der Aminogruppe stattfindet und der Alkylrest keine Rolle spielt, während bei länger werdender Stabilisatorkette der Einfluss der Alkylkette größer wird und die Wechselwirkung dort hauptsächlich nur noch über die Alkylkette läuft und nicht mehr über die Aminogruppe. Genauer sind die Ergebnisse des

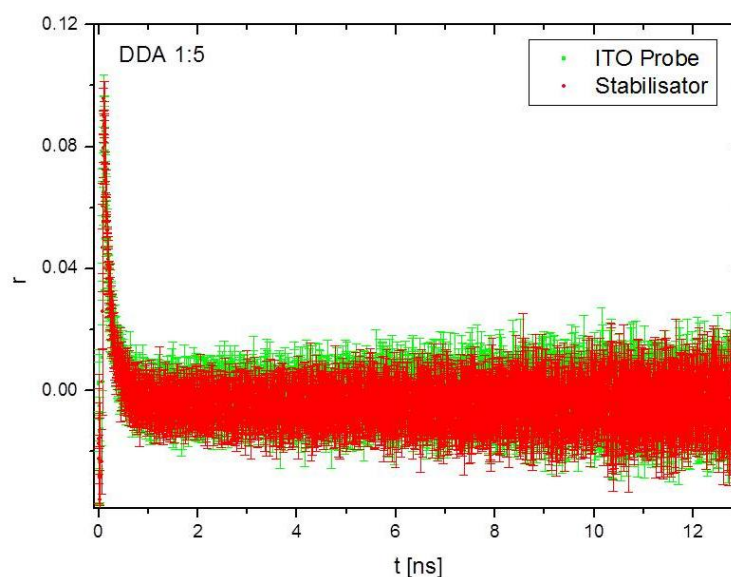
Projektpartners in Kapitel 6.2 bzw. in [GRO2012a] zu finden. Die  $(\text{CH}_2)_n\text{CH}_3$ -ITO Wechselwirkungen scheinen stabiler zu sein, als die  $\text{NH}_2$ -ITO Wechselwirkung.

Aus den genannten Ergebnissen der Fluoreszenzlebensdauer-messungen kann man vermuten, dass die Stabilisatoren horizontal auf der Partikeloberfläche angeordnet sind. Denn die Lebensdauerdifferenzen werden mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators größer. Bei einer vertikalen Anordnung würde sich die Auflage des Stabilisators und somit die Kontaktfläche zum Partikel mit Zunahme der Kettenlänge nicht ändern und der Einfluss des Partikels auf die Lebensdauer des angeregten Zustands der NBD-Gruppe sollte immer gleich sein. Die im nächsten Abschnitt gezeigten Ergebnisse zu den Anisotropiemessungen sollen Aufschluss darüber geben, ob diese Vermutung bestätigt werden kann.

### **Rotationskorrelationszeiten**

Die Anisotropiezerfallskurven der reinen Stabilisatorlösungen, sowie die der Partikellösungen zeigen ein monoexponentielles Abklingverhalten. Das monoexponentielle Abklingverhalten in den reinen Stabilisatorlösungen deutet darauf hin, dass sich die freien Chromophore in ihrer Rotationsdynamik wie ein prolater Rotor mit Polarisation entlang der langen Achse verhalten (siehe Abbildung 2-10 in Kapitel 2.4). Dies wird durch die Untersuchungen von Greenough und Blanchard (2007) und Hay et al. (2010) gestützt, die das Rotationsverhalten des in Größe und Geometrie vergleichbaren NBDAHA Chromophors untersucht haben, welches auch für die Stabilisierung der  $\text{ZrO}_2$  Partikel verwendet wurde, deren Ergebnisse in Kapitel 6.4 vorgestellt werden. Die Untersuchungen von Greenough und Blanchard wurden in Kapitel 3.4.2 kurz zusammen gefasst, die von Hey et al. sind in Abschnitt 2.4 nachzulesen.

In Abbildung 6-15 sind exemplarisch die mittleren Anisotropiezerfallskurven der mit Dodecylamin stabilisierten ITO-Proben und der entsprechenden Vergleichslösung im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 in der Dispersionsverdünnung 1:5 mit ihrer Standardabweichung dargestellt.



**Abb. 6-15** Anisotropiezerfallskurven für mit Dodecylamin stabilisierte ITO-Partikel und ihrer Stabilisatorlösung im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 in der Dispersionsverdünnung 1:5

Es sind keine Unterschiede in den Zerfallskurven zwischen Partikel- (grün) und reiner Stabilisatorlösung (rot) zu erkennen. Die beiden Kurven liegen übereinander. Die gefitteten Rotationskorrelationszeiten ( $\theta$ ) sind sehr kurz und ergeben ca. 180 ps. Vergleicht man die erhaltene Rotationskorrelationszeit mit der FWHM der IRF (siehe Kapitel 3.3), die 60 ps beträgt, so ist zu erkennen, dass man sich gerade noch im Bereich der sicheren Auflösung durch das Messsystem befindet, aber viel kürzere Rotationskorrelationszeiten nicht mehr sicher gemessen werden können.

Die Rotationskorrelationszeiten der Partikelproben sind für alle vermessenen Kettenlängen des Stabilisators nicht von den Rotationskorrelationszeiten ihrer Vergleichslösungen unterscheidbar. Da die Messergebnisse alle sehr ähnlich sind, wie die in Abb. 4-10 gezeigten, wird hier auf eine weitere Darstellung der anderen verzichtet. Die tabellarischen Ergebnisse der Messungen sind im Anhang zu finden (Kapitel 9.3).

Vergleicht man jedoch die Rotationskorrelationszeiten in Abhängigkeit der unterschiedlichen Kettenlänge der Stabilisatormoleküle, so ist ein Anstieg der Rotationskorrelationszeit mit Zunahme der Kettenlänge feststellbar. Tabelle 6.7 zeigt die mittleren Rotationskorrelationszeiten in Abhängigkeit der Kettenlänge an.

**Tab. 6.7** Abhängigkeit der mittleren Rotationskorrelationszeit  $\theta$  von der Kettenlänge des Stabilisators

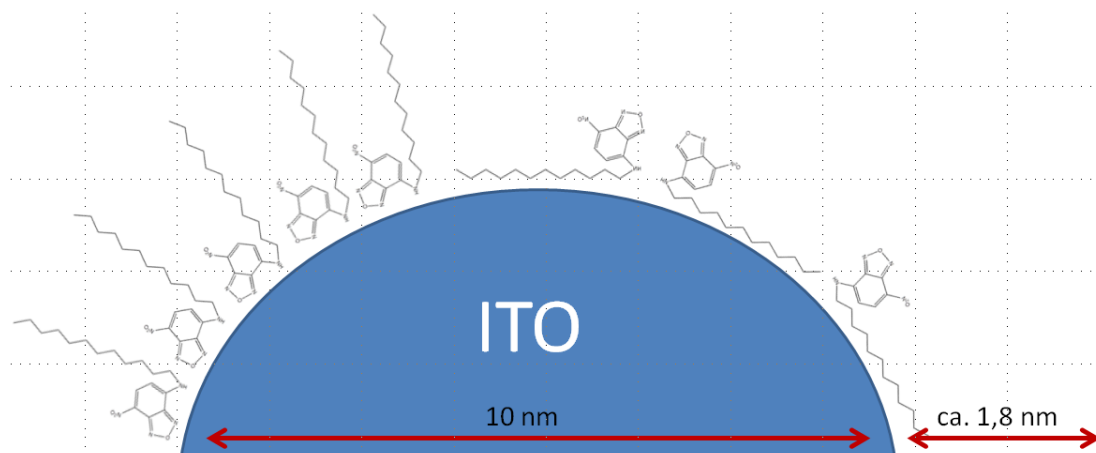
Kettenlänge	Rotationskorrelationszeit $\theta$ [ps]
<b>C<sub>3</sub></b>	120
<b>C<sub>7</sub></b>	140
<b>C<sub>8</sub></b>	150
<b>C<sub>12</sub></b>	180

Dies lässt sich als minimale Einschränkung in der freien Drehbarkeit der NBD-Gruppe an dem gelabelten Stabilisatormolekül mit Zunahme der Länge des Alkylgruppenschwanzes des Stabilisators verstehen. Es kommt jedoch zu keiner Einschränkung in der Drehbarkeit der NBD-Gruppe durch die Wechselwirkung des Stabilisatormoleküls mit der Partikeloberfläche. Dies ist, zusammen mit den Ergebnissen der Fluoreszenzlebensdauer-messungen, ein weiterer Beleg dafür, dass die Wechselwirkungen zwischen Stabilisator und Partikeloberfläche in diesem Partikelsystem sehr schwach sind. Auch in den Untersuchungen von Greenough und Blanchard an dem NBDAHA Chromophor in verschiedenen Vesikellösungen ergaben eine Rotationskorrelationszeit von 120 ps in Vergleichs- und Vesikellösung, wodurch auf eine ionische Wechselwirkung zwischen Chromophor und Vesikel geschlossen wurde (Kapitel 3.4.2 bzw. [GRE2006]).

Die ermittelten Rotationskorrelationszeiten zwischen 120 und 180 ps je nach Kettenlänge stimmen gut mit den in Kapitel 3.4.2 beschriebenen Untersuchungen von Greenough und Blanchard (2007) überein, die für den Chromophor NBDAHA je nach verwendetem Lösungsmittel Rotationskorrelationszeiten im Bereich von 50 ps im wenig viskosen Acetonitril bis hin zu 450 ps im viskoserem Propanol bestimmt haben.<sup>[GRE2007]</sup>

Die Vermutung aus den Fluoreszenzlebensdauer-messungen, dass die Stabilisatoren horizontal auf der Partikeloberfläche angeordnet sind, kann durch die Auswertung der Anisotropiemessungen weder bestätigt noch widerlegt werden. Genauer genommen gibt es zwei mögliche Hypothesen. Zum einem können die Ergebnisse der Rotationskorrelationszeiten so interpretiert werden, dass die Anordnung vertikal sein muss, da es zu keiner Verlängerung der Rotationskorrelationszeit bzw. zu keinem biexponentiellen Verhalten im Anisotropiezerfall der Partikelproben, mit einem langen Rotationszeitenanteil für die eingeschränkte Drehbarkeit des an den Partikel gebundenen Stabilisatormoleküls kommt (nicht-assoziiertes Anisotropiezerfall, siehe Kapitel 2.4).

Zum anderen könnten die Wechselwirkungen zwischen Stabilisator und Partikeloberfläche aber auch einfach so schwach sein, dass die freie Drehbarkeit der fluoreszierenden NBD-Gruppe auch bei horizontaler Anordnung nicht eingeschränkt wird. Abbildung 6-16 zeigt ein Modell der beiden möglichen Anordnungsmöglichkeiten.



**Abb. 6-16** Modell zur vertikalen, bzw. horizontalen Anlagerungshypothese am ITO-Partikelsystem

Die Anfangsanisotropie ohne Rotationsdiffusion ( $r_0$ ) deutet ebenfalls auf eine schwache Wechselwirkung hin, da sie überall sehr ähnlich ist. Sie zeigt keinen Unterschied zwischen Partikel- und Vergleichslösung an. Eine Abhängigkeit von  $r_0$  von der Kettenlänge des Stabilisatormoleküls fehlt ebenfalls. Allerdings war dies zu erwarten, denn die Kettenlänge des Stabilisatormoleküls sollte keinen Einfluss auf den Winkel zwischen Absorptions- und Emissionsdipolmoment der NBD-Gruppe haben, da nur das aromatische System einen Einfluss auf die Dipolmomentsänderung der NBD-Gruppe zwischen Absorption und Emission zeigt.<sup>[MUK1994]</sup> Die Werte für  $r_0$  liegen für die gesamten Messungen zwischen 0,07 und 0,09, d.h. der Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsübergangsmoment liegt zwischen  $53^\circ$  und  $56^\circ$  (Kapitel 2.4).

Um die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauer- und Anisotropiemessungen der mit *n*-Alkylaminen stabilisierten ITO-Nanopartikel besser einordnen zu können und die Interpretation der Ergebnisse in Bezug auf eine mögliche Anordnung der Stabilisatormoleküle an der Partikeloberfläche zu überprüfen, bzw. zu erweitern, wurden zusätzlich Messungen an ITO-Nanopartikeln vor genommen, die mit Diaminen stabilisiert worden sind. Diese Partikelsysteme sind auch in Alkoholen stabil, sodass in Lösungen hoher Viskosität gearbeitet werden kann, was die Auswertung und Interpretation der Anisotropiedaten begünstigt. Die Ergebnisse dieser Messungen werden im Folgenden Abschnitt vorgestellt.



### 6.4.2 Diamine

Auch bei der Untersuchung dieses Partikelsystems ging es zunächst darum festzustellen, ob es Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer oder den Anisotropiedaten zwischen den Partikel- und den reinen Stabilisatorlösungen gibt, die auf eine Wechselwirkung der Stabilisatormoleküle mit der Partikeloberfläche hinweisen.

Im Gegensatz zu der Stabilisierung mit *n*-Alkylaminen, die nur in Chloroform gut funktioniert, ist die Stabilisierung über die Diamine in Alkoholen am effektivsten. Mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators wird der hydrophobe Charakter der *n*-Alkylamine größer, so dass eine Stabilisierung in Alkoholen nicht mehr möglich ist. Im Falle der Stabilisierung mit Diaminen ermöglicht die zweite endständige Aminogruppe eine bessere Kompatibilität zu Alkoholen als Lösungsmittel.<sup>[ZEL2014a]</sup> Dies erschwert zwar die Vergleichbarkeit beider Systeme miteinander, ermöglicht aber gleichzeitig eine Untersuchung des Einflusses der Viskosität des Lösungsmittels auf die Stabilisierung der Nanopartikel, indem Messungen an verschiedenen Partikellösungen in unterschiedlich viskosen Alkoholen durchgeführt werden. So lässt sich gut überprüfen, wie sich die Lebensdauer und die Rotationskorrelationszeit mit der Viskosität der Lösung verändern. Je langkettiger der Alkohol, desto viskoser die Lösung und umso länger sollte nach dem Debye-Stokes-Einstein Modell (Kapitel 2.4, Gleichung 2.34) die Rotationskorrelationszeit sein, da die Molekülbewegungen eingeschränkt werden.

Zusätzlich kann überprüft werden, wie sich die Fluoreszenzlebensdauer bei Änderungen der Polarität verhält, denn diese sinkt mit Zunahme der Kettenlänge des Alkohols. In Tabelle 6.8 sind die Viskositäten und Polaritäten der verwendeten Lösungsmittel zur Übersicht dargestellt.

**Tab. 6.8** Viskositäten und Polaritäten der verwendeten Lösungsmittel

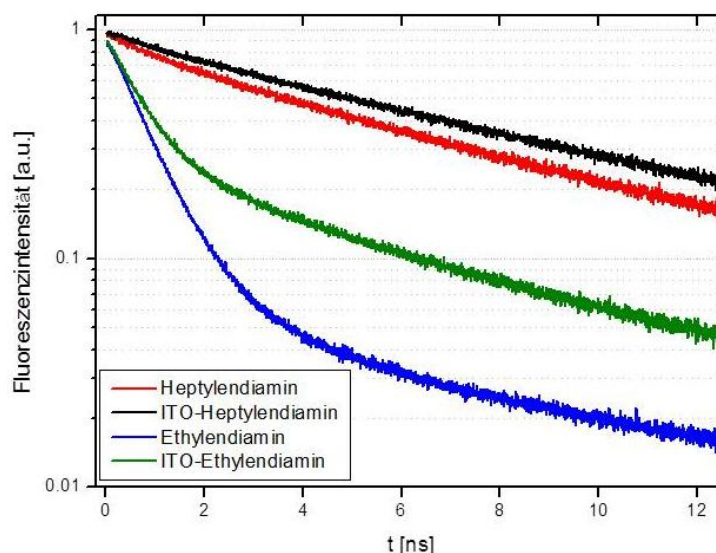
LSM	Viskosität $\eta$ [mPas]	Polarität $E_T(30)$ [kcal/mol]
<b>Chloroform</b>	0,56	39,1
<b>Ethanol</b>	1,19	51,9
<b>Butanol</b>	2,4	50,2
<b>Hexanol</b>	5,9	48,8
<b>Decanol</b>	13,8	47,6

Bei den *n*-Alkylaminen als Stabilisator konnte kein Unterschied in der Rotationskorrelationszeit zwischen Partikellösung und Vergleichslösung gefunden werden (siehe Kapitel 6.4.1). In beiden Fällen sind die Rotationskorrelationszeiten sehr kurz und so könnten Unterschiede zwischen den beiden evtl. nicht aufgelöst werden. Da die mit *n*-Alkylaminen stabilisierten Partikel nur in Chloroform stabil sind, konnte dort kein viskoseres Lösemittel gewählt werden um dadurch eventuelle Unterschiede doch aufdecken zu können. Aus diesem Grund wurden zusätzlich Diamine für die Stabilisierung verwendet, da diese in Alkoholen verschiedener Kettenlänge und Viskosität stabilisiert werden können. Dabei sollte die Stabilisator-Partikel Wechselwirkung sehr ähnlich zum mit *n*-Alkylaminen stabilisierten System sein und der Einfluss der Viskosität des Lösemittels auf die Stabilisierung und auf die Rotationskorrelationszeit kann bestimmt werden. Zum anderen bietet dieses Partikelsystem den Vorteil, dass pro Stabilisatormolekül zwei Aminogruppen vorhanden sind, die mit der Partikeloberfläche oder dem Farbstoff wechselwirken können. Da bei der Stabilisierung der ITO-Partikel mit den *n*-Alkylaminen kein Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnis erkannt werden konnte, werden hier nur Partikeldispersionen in Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1 untersucht. Für jedes Lösungsmittel jeweils zwei Chargen in mehreren Dispersionsverdünnungen vermessen. Dabei wurden zu jeder Dispersionsverdünnung einer Charge mindestens fünf Messungen durchgeführt.

### **Fluoreszenzlebensdauer**

Vorab lässt sich sagen, dass die Fluoreszenzabklingkurven der Ethylendiaminlösungen, wie auch die der mit Ethylendiamin stabilisierten Partikeldispersionen biexponentielles Verhalten zeigen, ein Beispiel dazu wurde bereits in Kapitel 2.3 in Abbildung 2-5 gegeben.

Um herauszufinden, ob die kurze Distanz zwischen den beiden Aminogruppen im Ethylendiamin für das biexponentielle Fluoreszenzverhalten verantwortlich ist, wurde eine Versuchsreihe mit Heptylendiamin in Decanol vermessen. In der folgenden Abbildung sind beispielhaft die Fluoreszenzabklingkurven für eine solche Messung im Vergleich zu einer Messung mit Ethylendiamin gegenüber gestellt.

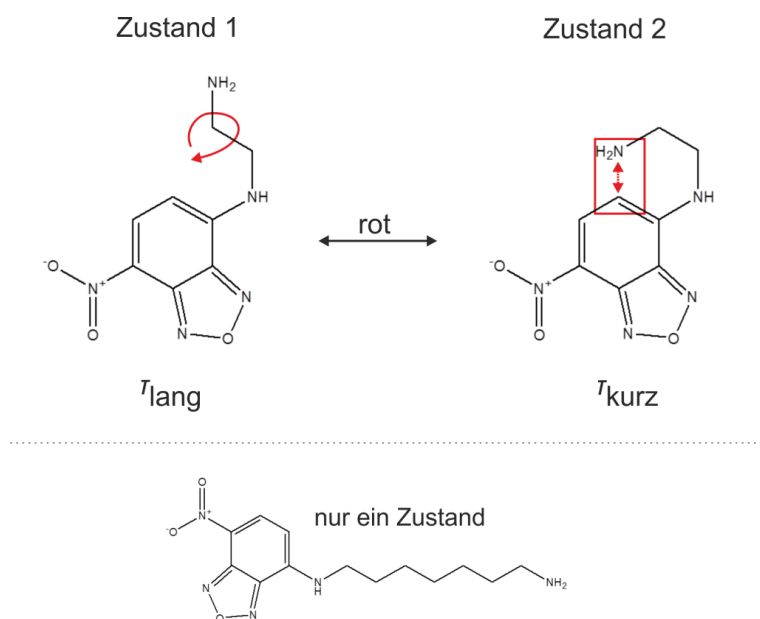


**Abb. 6-17** Vergleich der Fluoreszenzabklingkurven von Partikel- und Vergleichslösung für die Stabilisierung mit Ethylendiamin und Heptylendiamin in Decanol

Dabei ist in der logarithmischen Auftragung gut zu erkennen, dass die Abklingkurven für das langkettige Diamin monoexponentiell sind und zwar in der Vergleichslösung, wie auch in der Partikellösung. Zusammen mit den im vorangegangenen beschriebenen Ergebnissen lässt sich daraus schließen, dass die Natur des kurzkettigen Ethylendiamins im Zusammenspiel mit der NBD-Gruppe für das biexponentielle Verhalten des Fluoreszenzzerfalls verantwortlich zu sein scheint.

In Kapitel 2.3 wurden die Ursachen, für ein multiexponentielles Abklingverhalten der Fluoreszenz bereits erläutert. In diesem Fall kann ausgeschlossen werden, dass eine unterschiedliche Umgebung des Fluorophors dieses Verhalten auslöst. Denn beide Umgebungen (reine Stabilisatorlösung und stabilisierte Partikellösung) weisen eine einheitliche Exponentialität im Abklingverhalten auf. Da die NBD-Gruppe nur Fluoreszenz zeigt, wenn sie an eine Aminogruppe gebunden ist, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass mehrere Fluorophore zu dem biexponentiellen Abklingverhalten führen. So kann angenommen werden, dass im Falle des Ethylendiamins zwei Zustände angeregt werden, die zu zwei Fluoreszenzlebensdauern führen. Es ist wahrscheinlich, dass der relativ kurze Abstand zwischen den beiden Aminogruppen des Ethylendiamins dafür verantwortlich ist.

In Abbildung 6-18 ist diese denkbare Hypothese dargestellt. Dabei kann man davon ausgehen, dass sich die endständige Aminogruppe z.B. durch eine Rotation um die Einfachbindung (roter Pfeil) dem aromatischen Ring der NBD-Gruppe nähert und somit mit ihr wechselwirkt und die kurze Lebensdauer verursacht.



**Abb. 6-18** Vorstellbare Hypothese für das Vorliegen von zwei Lebensdauern im Falle des Ethylendiamins: Durch Rotation um eine Einfachbindung kommt die endständige Aminogruppe dem aromatischen Ring nahe und es kommt zur Wechselwirkung. Beim Heptylendiamin ist die Endständige Aminogruppe zu weit entfernt.

Um das Phänomen des biexponentiellen Fluoreszenzverhaltens besser einordnen zu können, sollten weiterführende quantenmechanische Rechnungen am Ethylendiamin in verschiedenen Lösungsmitteln durchgeführt werden.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdaueranalyse für die verschiedenen Lösungsmittel gezeigt.

### Verschiedene Lösungsmittel und Dispersionsverdünnungen

Aufgrund der großen Anzahl an durchgeführten Messungen wird auf eine Darstellung der einzelnen Messkurven verzichtet und die Ergebnisse direkt graphisch dargestellt.

In den einzelnen Grafiken ist auf der linken Seite der y-Achse der jeweilige Anteil der Lebensdauern an der Gesamtfluoreszenz (siehe Gleichung 2.21) gegen die Dispersionsverdünnung aufgetragen, während auf der rechten Seite der y-Achse die absoluten Werte für die beiden Lebensdauern gegen die Dispersionsverdünnung aufgetragen sind. Die Farben sind entsprechend der Legende verteilt: Rot steht für den Anteil (Balken) und für den absoluten Wert (Kurve) der kurzen Lebensdauer in der Stabilisator- bzw. Vergleichslösung, wo hingegen Schwarz für die lange Lebensdauer in der Vergleichslösung steht. Die Farben Blau und Grün stehen analog für die kurze und lange Lebensdauer in den Partikellösungen. Die Abbildungen zeigen die statistische Auswertung der Lebensdauern und deren Anteil für beide Chargen. Hier wurden die 5 Messungen aus Charge 1 und die 5 Messungen aus Charge

2 gleichwertig behandelt und der statistische Mittelwert und der statistische Fehler bestimmt, da dieser größer ist, als der Fehler der Einzelfits. Aufgrund der Abweichung der beiden Chargen voneinander, ist somit auch der statistische Fehler hier relativ groß. Durch diese Art der Darstellung der Ergebnisse werden die Fehler nicht unterschätzt. Man sollte jedoch dabei immer bedenken, dass der größte Fehler aufgrund der Varianz zwischen den jeweiligen Chargen auftritt und die Fehler einer Einzelmessung sehr gering sind, wie auch die Abweichungen der Messungen innerhalb einer Charge viel kleiner sind, als die hier angegebenen. Diese Art der Auftragung ist jedoch übersichtlicher als die Auftragung der beiden Chargen getrennt voneinander, da das gemeinsame Auftragen von Anteil und absoluten Wert für die einzelnen Lebensdauern in einer Abbildung schon etwas unübersichtlich ist. Im Anhang ist beispielhaft gezeigt, wie die Auswertung der Chargen unabhängig voneinander aussieht, am Beispiel der Messungen in Butanol (Kapitel 9.3). Nun folgt die Interpretation der Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen an den mit Diaminen stabilisierten ITO-Partikeln in unterschiedlichen Alkoholen. Die erhaltenen Fluoreszenzlebensdauern sind in den Abbildungen nur zu einer besseren Sichtbarkeit durch Linien miteinander verbunden worden. Der Verlauf dieser Linien kann nicht als lückenloser, tatsächlicher Verlauf der Messwerte angesehen werden.

### Ethanol (EtOH)

In Abbildung 6-19 sind die Ergebnisse der in Ethanol und mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Partikel zu sehen.

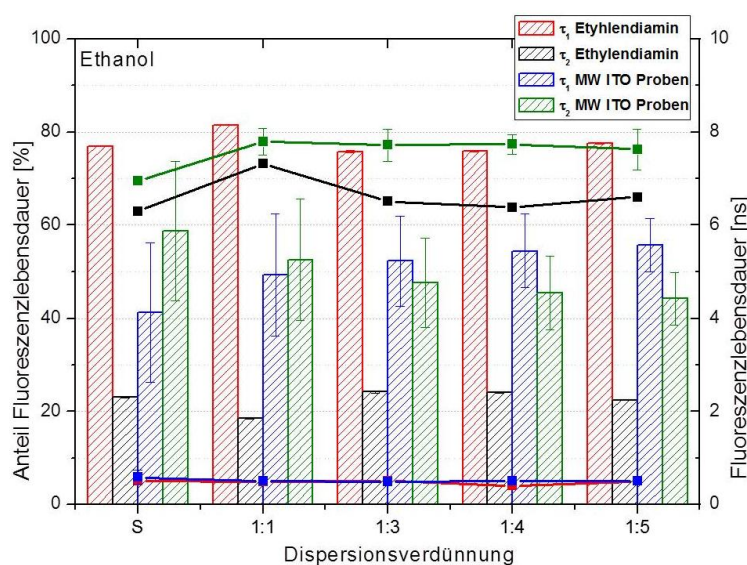


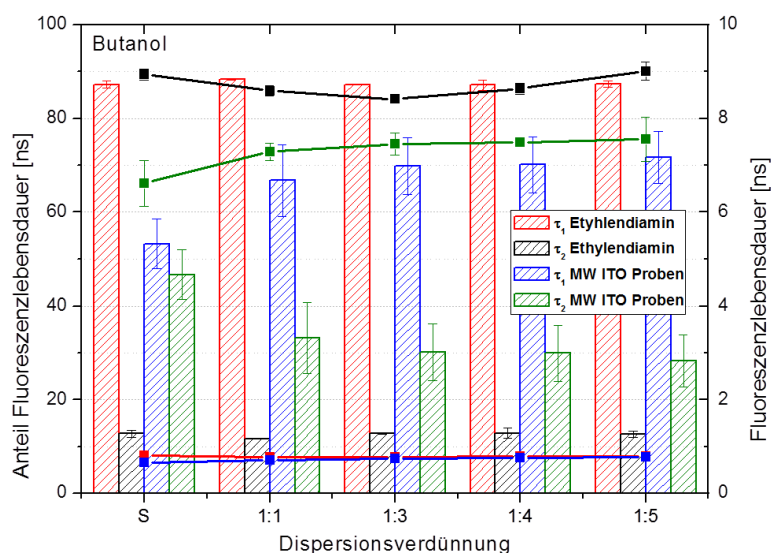
Abb. 6-19 Stabilisierung mit Ethylendiamin in Ethanol

Im Gegensatz zu den *n*-Alkylamin-Proben aus dem vorherigen Abschnitt (Kapitel 6.4.1) ist der Fluoreszenzzerfall von mit NBD-F gelabeltem Ethylendiamin in Ethanol biexponentiell. In der reinen Stabilisatorlösung beträgt die kurze Lebensdauer 0,5 ns und besitzt einen Anteil von ca. 75%. Die lange Lebensdauer hat einen Wert von 6,5 ns und macht die restlichen 25% an der Gesamtintensität der Fluoreszenz aus. Diese Werte bleiben über den gesamten Bereich der Dispersionsverdünnung konstant, lediglich die Dispersionsverdünnung 1:1 zeigt eine leichte Abweichung. Betrachtet man die Lebensdauern der Partikeldispersionen mit den Stabilisatorlösungen, so fallen deutliche Unterschiede auf, die für eine Wechselwirkung der Stabilisatormoleküle mit der Partikeloberfläche sprechen. Die kurze Lebensdauer liegt zwar weiterhin bei 0,5 ns, aber die lange Lebensdauer steigt auf etwa 7,7 ns an, welches eine bessere Stabilisierung des angeregten Zustands der NBD-Gruppe, im Vergleich zur reinen Stabilisatorlösung anzeigt. Auch hier bleiben die absoluten Werte der Lebensdauern über den gesamten Konzentrationsbereich der Dispersionen konstant. Die jeweiligen Anteile ändern sich jedoch, so dass der Anteil der kurzen Lebensdauer je nach Dispersionsverdünnung nur noch 55-41 % ausmacht, im Gegensatz zur Stabilisatorlösung, wo sie einen Anteil von 75% hat. Demnach steigt nicht nur der absolute Wert der langen Lebensdauer leicht an, sondern auch ihr Anteil wird größer. Dies deutet auf eine stärkere Bevölkering und Stabilisierung des angeregten Zustands mit der langen Lebensdauer hin. Durch die Wechselwirkung mit dem Partikel kann die Energie langsamer abfließen.

Die etwas groß wirkenden Schwankungen in den Anteilen der Fluoreszenzlebensdauern, kommen durch die Mittelwertbildung über beide Partikelchargen zu Stande, die innerhalb einer Charge nur kleine Abweichungen besitzen, aber von Charge zu Charge größere Unterschiede haben. (Kapitel 9.3).

### **Butanol (BuOH)**

In Abbildung 6-20 sind die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauerbestimmung der in Butanol stabilisierten ITO-Partikel dargestellt.



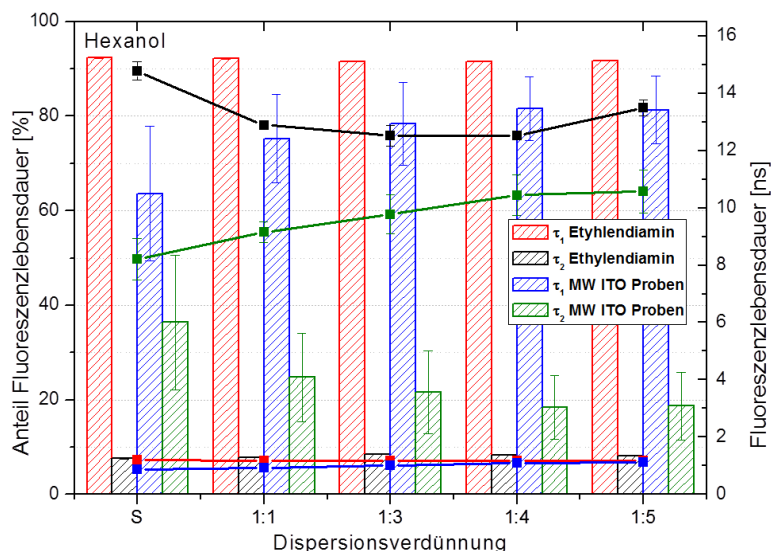
**Abb. 6-20** Stabilisierung mit Ethylendiamin in Butanol

Auch hier werden zwei Lebensdauern mit unterschiedlichen Anteilen an der Gesamtfluoreszenz erhalten. Die reine Stabilisatorlösung unterscheidet sich ebenfalls deutlich von der Partikellösung. In der Stabilisatorlösung macht die kurze Lebensdauer ca. 87% aus und ist mit 0,78 ns etwas länger als in Ethanol (0,5 ns). Die lange Lebensdauer ist ebenfalls etwas länger als in Ethanol gemessen. Sie beträgt 8,5-9 ns und macht ca. 13 % an der Gesamtfluoreszenz aus. Der Wert der kurzen Lebensdauer in der Partikellösung entspricht ziemlich genau dem in der Stabilisatorlösung, so dass die Wechselwirkung mit der Partikeloberfläche nur die lange Lebensdauer betrifft. Denn diese unterscheidet sich stark von der in der Stabilisatorlösung. Im Gegensatz zu der Stabilisierung in Ethanol wird hier die lange Lebensdauer in der Partikellösung kürzer, sie sinkt auf ca. 7,5 ns. Das heißt die Energie dieses angeregten Zustands fließt durch die Wechselwirkung mit der Partikeloberfläche schneller ab, der Zustand wird destabilisiert. Der Anteil der langen Lebensdauer ist in den Partikellösungen allerdings viel größer (wie auch in Ethanol der Fall), so dass dieser Zustand in den Partikellösungen stärker bevölkert ist. Der Anteil sinkt mit Zunahme der Dispersionsverdunnung auch wieder leicht ab, von ca. 48 % auf ca. 29%.

Im Vergleich zu der Messreihe in Ethanol sind hier die langen Lebensdauern in der Partikellösung niedriger als in der Stabilisatorlösung. In Ethanol wird der angeregte Zustand in der Partikellösung gegenüber dem in der Stabilisatorlösung stabilisiert. Dies deutet auf einen Einfluss des Lösungsmittels auf die Partikel-Stabilisatorwechselwirkung hin. Deshalb wird ein besonderes Augenmerk auf die weiteren Messreihen mit höheren Alkoholen gelegt.

## Hexanol (HexOH)

Die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauermessungen der in Hexanol mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Partikel sind in Abbildung 6-21 zu sehen.



**Abb. 6-21** Stabilisierung mit Ethylendiamin in Hexanol

Der Fluoreszenzzerfall von mit NBD-F gelabeltem Ethylendiamin in Hexanol zeigt entsprechend den Messungen in Ethanol und Butanol auch biexponentielles Verhalten. In der reinen Stabilisatorlösung liegt die kurze Lebensdauer bei etwa 1,2 ns und hat einen Anteil von ca. 92% und ist über den gesamten Konzentrationsbereich sehr konstant. Die lange Lebensdauer weist einen Anteil von 8% auf und liegt bei ca. 12,6-13,4 ns, lediglich in der unverdünnten Dispersion S weicht sie mit 14,8 ns etwas vom sonst sehr konstanten Verhalten ab. Auch in Hexanol unterscheiden sich die Lebensdauern der Stabilisatorlösung von denen in der Partikellösung. Es ändern sich die Anteile und absoluten Werte für die Fluoreszenzlebensdauern. Die kurze Lebensdauer liegt bei der unverdünnten Dispersion bei 0,6 ns und damit unterhalb der Lebensdauer in der Stabilisatorlösung. Mit Zunahme der Verdünnung steigt die Lebensdauer aber und nimmt bei der Verdünnung 1:5 mit 1,1 ns fast exakt den Wert für die Lebensdauer in der reinen Stabilisatorlösung an. Allerdings unterscheidet sich der Anteil der kurzen Lebensdauer an der Gesamtlebensdauer im gesamten Konzentrationsbereich von dem in der reinen Stabilisatorlösung. Anfangs liegt ihr Anteil bei ca. 63% und fällt damit deutlich geringer aus als in der Vergleichslösung, steigt mit Zunahme der Verdünnung aber wieder auf ca. 81%. Damit liegt sie bei einer Verdünnung von 1:5 noch immer deutlich unterhalb des Anteils in der Vergleichslösung. Die lange Lebensdauer liegt in der unverdünnten Dispersion bei 8,1 ns und steigt mit der Verdünnung bis auf 10,6 ns

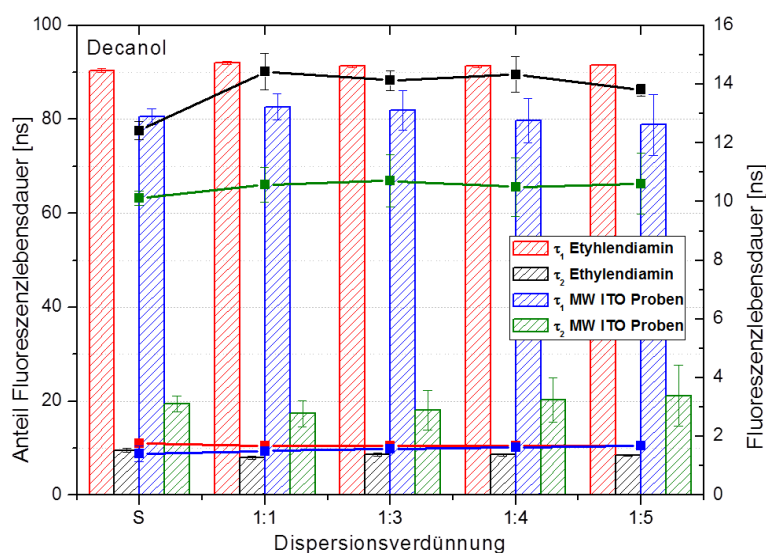


(Verdünnung 1:5) an. Der Anteil sinkt von ca. 36% auf ca. 18% ab im Laufe der Verdünnung. Doch auch hier unterscheidet sie sich am Ende immer noch klar von der langen Lebensdauer in der Vergleichslösung. Demnach sind die kurzen Lebensdauern in ihren absoluten Werten vergleichbar in Vergleichs- und Partikellösung, während der Anteil in der Partikellösung deutlich kleiner ist, aber mit der Verdünnung wieder leicht steigt.

Die langen Lebensdauern unterscheiden sich in ihren absoluten Werten stark voneinander (12-14 ns bzw. 8-10 ns) und auch der Anteil ist in der Partikellösung größer, auch wenn dieser mit der Verdünnung wieder leicht sinkt. Auch hier wird also der angeregte Zustand mit der langen Lebensdauer in der Partikellösung destabilisiert, gegenüber der reinen Stabilisatorlösung, dieser Zustand aber stärker bevölkert.

### Decanol (DecOH)

Die Ergebnisse der Messungen in Decanol sind in Abbildung 6-22 zu sehen.

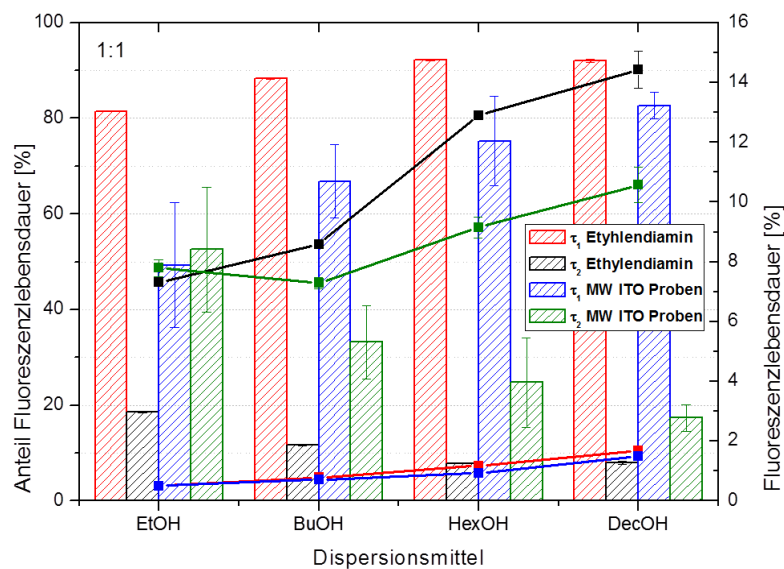


**Abb. 6-22** Stabilisierung mit Ethylenediamin in Decanol

Auch in Decanol ist der Fluoreszenzzerfall von mit NBD-F gelabeltem Ethylenediamin biexponentiell. In der reinen Stabilisatorlösung besitzt die kurze Lebensdauer im gesamten Konzentrationsbereich einen konstanten Anteil von ca. 92% und liegt bei 1,7 ns. Die lange Lebensdauer liegt bei ca. 14,2 ns und macht 8% an der Gesamtfluoreszenz aus. Nur die unverdünnte Dispersion fällt dort etwas aus der Reihe, da die lange Lebensdauer dort nur 12,5 ns beträgt. Dies kann evtl. auf ein Fluoreszenzquenching zurückgeführt werden, aufgrund einer hohen Stabilisatorkonzentration und damit verbundenen Stößen innerhalb der Lösung, die den angeregten Zustand destabilisieren.

Die Partikellösung zeigt auch in Decanol wieder deutliche Unterschiede zur Vergleichslösung. Die kurze Lebensdauer ist mit ca. 1,7 ns vom absoluten Wert her sehr ähnlich in der Vergleichs- und in der Partikellösung. Ihr Anteil an der Gesamtfluoreszenz ist in der Partikellösung mit ca. 81% aber geringer. Bei der langen Lebensdauer sind die Differenzen größer, mit ca. 10,6 ns ist die Lebensdauer in der Partikellösung deutlich kürzer als in der Vergleichslösung. Ihr Anteil an der Gesamtfluoreszenz ist mit ca. 19% höher. Gernerell ist bei Decanol allerdings keine Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauer von der Dispersionsverdünnung erkennbar. Auch die Anteile der Lebensdauern bleiben über den gesamten Bereich der Dispersionsverdünnungen konstant.

In den vorangegangenen Abbildungen wurde die Fluoreszenzlebensdauer der Partikel- und Vergleichslösungen immer gegen die Dispersionsverdünnung aufgetragen, um auf eine Unterscheidbarkeit von Vergleichs- und Partikellösung zu untersuchen, sowie den Einfluss der Verdünnung zu bestimmen. Im Folgenden wird nun die Dispersionsverdünnung konstant gehalten und die Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit des Lösungsmittels dargestellt, um den Einfluss des Lösungsmittels auf die Lebensdauer und somit evtl. auch auf die Stabilisierung der Partikel zu verdeutlichen.



**Abb. 6-23** Untersuchung des Lösungsmiteinflusses auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstanter Dispersionsverdünnung von 1:1

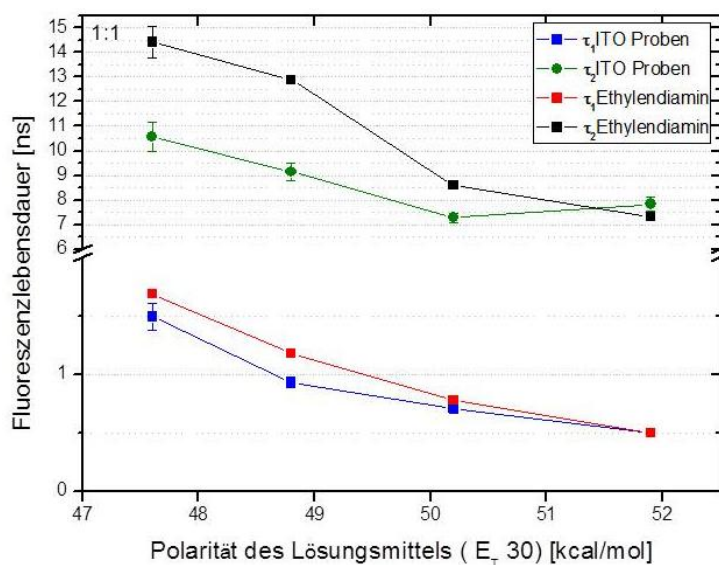
Abbildung 6-23 zeigt dies exemplarisch für die Dispersionsverdünnung 1:1. Die Abbildungen der anderen Dispersionsverdünnungen sind im Anhang zu finden (Kapitel 9.3). Da sie der hier gezeigten sehr ähnlich sind, wird auf eine Aufführung an dieser Stelle verzichtet.

Allgemein ist ein deutlicher Unterschied in der Lebensdauer zwischen Vergleichs- und Partikellösung zu erkennen. Dieser steigt sogar mit Zunahme der Kettenlänge des Alkohols. Generell steigen die Lebensdauern (kurze und lange) mit Zunahme der Viskosität bzw. Kettenlänge des Lösungsmittels. Die absoluten Werte der kurzen Lebensdauern sind sehr ähnlich in den Vergleichs- und Partikellösungen. Die Unterscheidung kommt hier hauptsächlich durch die unterschiedlichen Anteile an der Gesamtfluoreszenz zu Stande, die in den Partikellösungen niedriger ausfallen.

Bei der langen Lebensdauer gibt es einen deutlichen Unterschied in den absoluten Werten, als auch in den Anteilen. Bis auf in Ethanol, ist in den Partikellösungen die lange Lebensdauer kürzer als in den Vergleichslösungen. D.h. hier wird der angeregte Zustand geschwächt. Die Energie kann in den Partikellösungen besser abfließen. Im Falle des Ethanols wird der entsprechende angeregte Zustand in den Partikellösungen leicht stabilisiert und daraus resultiert eine längere Lebensdauer. Die Anteile für die lange Lebensdauer sind in den Partikellösungen größer. Dies deutet darauf hin, dass der Zustand, der für die längere Lebensdauer verantwortlich ist, in den Partikelproben stärker bevölkert ist, als der Zustand mit der kurzen Lebensdauer. Mit Zunahme der Verdünnung sinkt der Anteil entsprechend wieder ab.

### **Polarität des Lösungsmittels**

Um zu klären, ob es sich bei dem oben genannten Verhalten der Fluoreszenzlebensdauern um den Einfluss der Polarität des Lösungsmittels auf den angeregten Zustand des Farbstoffs handelt, sind in der nächsten Abbildung (Abb. 6-24) die Fluoreszenzlebensdauern gegen die Polarität der Lösungsmittel in Form der  $E_T(30)$  Skala aufgetragen.



**Abb. 6-24** Untersuchung des Einflusses der Polarität des Lösungsmittels auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstantem Dispersionsverhältnis von 1:1

Man sieht ein komplementäres Verhalten im Vergleich zu Abbildung 6-23. Dies liegt daran, dass Ethanol mit 51,9 kcal/mol den höchsten  $E_T(30)$  Wert aufweist und von allen verwendeten Alkoholen am polarsten ist. Die Polarität sinkt mit Zunahme der Länge des Alkylrestes des Alkohols, so dass Decanol von den verwendeten Lösungsmitteln am unpolarsten ist. Allerdings spannen die  $E_T(30)$  Werte nur einen geringen Bereich von 47,6-51,9 kcal/mol auf (siehe Tab. 6.8). Der Unterschied in der Polarität ist also nicht sehr groß. Dennoch sinken die Lebensdauern in diesem Bereich stark. Ein polares Lösungsmittel stabilisiert den Grundzustand.

Fery-Forgues et al. (1993) haben bei der Untersuchung der spektroskopischen Eigenschaften von zwei NBD-Derivaten in Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität festgestellt, dass die Fluoreszenzlebensdauer für *n*-Propylamino-NBD und *N,N*-Diethylamino-NBD in unpolaren, bzw. leicht polaren, oder aprotischen Lösungsmitteln näherungsweise konstant ist, während sie für polare oder protische Lösungsmittel stufenweise sinkt (siehe Kapitel 3.4.2). Eine Erklärung dafür soll die Zunahme an strahlungslosen Prozessen bei der Entvölkerung des angeregten Zustands sein.<sup>[FER1993]</sup>

Greenough und Blanchard (2007) haben ähnliche Untersuchungen durchgeführt, indem sie die Fluoreszenzlebensdauer des NBD-Chromophors in Abhängigkeit von der Seitengruppenidentität an der Aminofunktion in verschiedenen protischen, polaren, sowie aprotischen Lösungsmitteln bestimmt haben (siehe Kapitel 3.4.2). Dabei haben sie ihre experimentellen Daten ebenfalls gut mit der  $E_T(30)$  Skala in Einklang bringen können. Als Ursache für die sinkende Lebensdauer mit Zunahme der Polarität nennen sie eine

Kombination von Reibungskräften, dielektrischen Wechselwirkungen, sowie Wasserstoffbrückenbindungen zu der näheren Umgebung des Chromophors. Sie beschreiben die Wechselwirkung zwischen Chromophor und Solvenz als Dipol-Dipol, bzw. Dipol-induzierte Dipol-Kopplung. Je polarer das Lösungsmittel ist, desto größer werden die Wechselwirkungen zwischen Chromophor und Lösungsmittel, da der Chromophor mit der elektronenliefernden Aminogruppe, sowie der als Elektronentank wirkenden Nitrogruppe am aromatischen Ring selbst polar ist, und umso größer ist die Möglichkeit der strukturellen oder elektrischen Änderung der Wellenfunktion des angeregten Zustands, des Chromophors, so dass die nicht radiativen Prozesse für die Entvölkerung des angeregten Zustands stark zunehmen.<sup>[GRE2007]</sup>

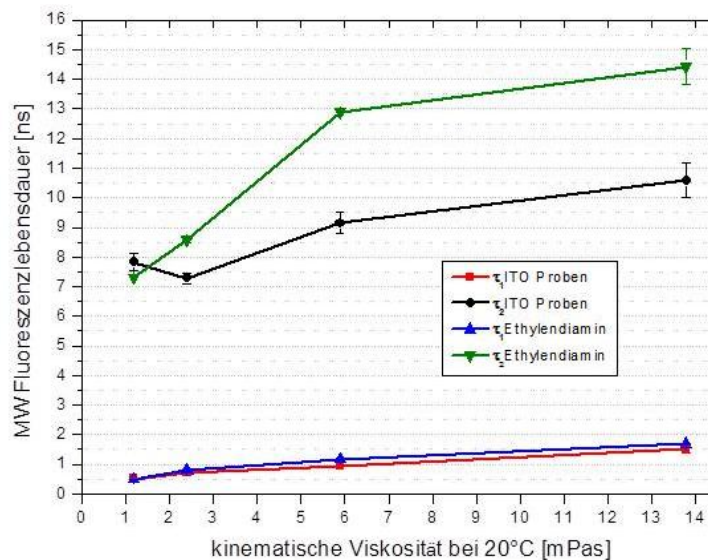
Der in Abbildung 6-24 gezeigte Trend im Verlauf der Fluoreszenzlebensdauer in Abhängigkeit von der Polarität des Lösungsmittels wird also von diesen beiden Forschergruppen bestätigt, auch wenn in diesem Fall die Polaritätsunterschiede nicht sehr groß sind.

### Viskosität des Lösungsmittels

Im nächsten Abschnitt wird der Einfluss der Viskosität des Lösungsmittels auf das Fluoreszenzverhalten untersucht. Fery-Forgues et al. (1993) haben neben dem Einfluss der Polarität auch den der Viskosität auf das Fluoreszenzverhalten ihrer beiden Modellkomponenten *n*-Propylamino-NBD und *N,N*-Diethylamino-NBD untersucht. Für das *n*-Propylamino-NBD blieb die Lebensdauer bei annähernd vergleichbarer Polarität aber unterschiedlicher Viskosität konstant, während sie sich für *N,N*-Diethylamino-NBD verdoppelt, wenn die Viskosität um 11 cP zunimmt (siehe Kapitel 3.4.2.) Die Geschwindigkeitskonstante der radiativen Prozesse ( $k_F$ ) bleibt unverändert, während die der strahlungslosen Prozesse ( $k_{nr}$ ) mit steigender Viskosität sinkt.<sup>[FER1993]</sup> Nach Gleichung 2.20 in Kapitel 2.3 steigt somit die Fluoreszenzlebensdauer.

Das *N,N*-Diethylamino-NBD zeigt also eine stärkere Abhängigkeit von dynamischen Lösungsmittelveränderungen als das *n*-Propylamino-NBD. Der Grund soll eine Relaxation des angeregten, intramolekularen Charge-Transfer Zustands (ITCT) in einen energetisch niedrigeren, verdrehten Charge-Transfer Zustand sein (Kapitel 3.4.2).<sup>[BEL1989], [RET1988], [FER1993]</sup>

In Abbildung 6-25 ist die Abhängigkeit der Fluoreszenzlebensdauern des mit NBD-F gelabelten Ethylendiamins dargestellt.



**Abb. 6-25** Untersuchung des Einflusses der Viskosität des Lösungsmittels auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstantem Dispersionsverhältnis von 1:1

Es ist gut zu sehen, dass die Lebensdauern mit Zunahme der Viskosität steigen.

Dieses Verhalten passt zu dem zuvor genannten des *n*-Propylamino-NBDs aus den Untersuchungen von Fery-Forgues et al. (1993) (Kapitel 3.4.2). Es wäre denkbar, dass es auch beim mit NBD-F gelabeltem Ethyldiamin einen solchen ITCT Zustand gibt, der durch einen strahlungslosen Zerfall entvölkert wird. Mit Zunahme der Viskosität des Lösungsmittels sinkt die Wahrscheinlichkeit, dass dieser Zustand bevölkert wird und die beiden Lebensdauern steigen.

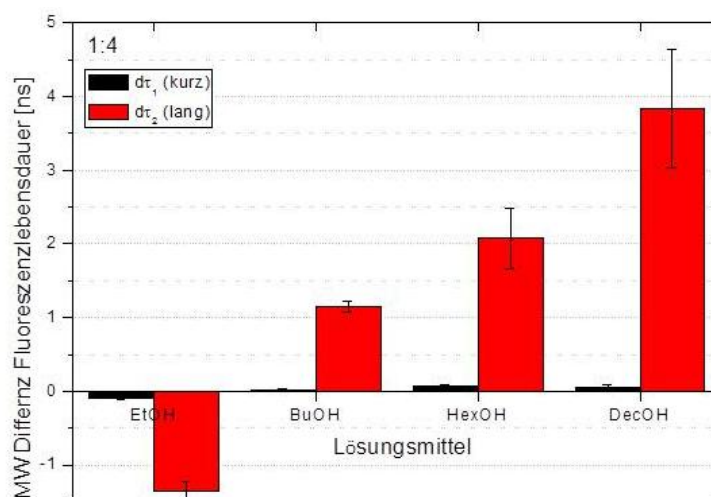
### Zusammenfassung Fluoreszenzlebensdauer

Aus den bisherigen Erläuterungen lässt sich zusammenfassen, dass die kurze Lebensdauer ( $\tau_1$ ) in den Partikellösungen und Vergleichslösungen sehr ähnlich ist. Sie wird in der Partikellösung und der Vergleichslösung vergleichbar von Änderungen der Polarität oder Viskosität des Lösungsmittels beeinflusst. Die lange Lebensdauer ( $\tau_2$ ) hingegen unterscheidet sich deutlich zwischen Partikel- und Vergleichslösung. Außer in Ethanol ist die lange Lebensdauer in der Partikellösung immer kürzer als in der Stabilisatorlösung. Der Einfluss von Viskosität und Polarität des Lösungsmittels auf die lange Lebensdauer ist in den Partikellösungen geringer als in den Stabilisatorlösungen.

Da nicht nur die absoluten Werte der langen Lebensdauer in den Partikellösungen kürzer sind, sondern auch die relativen Anteile dieser Lebensdauer in den Partikellösungen höher ausfallen als in den Stabilisatorlösungen scheint es so, als wenn der dazugehörige Zustand durch die Partikelwechselwirkung stärker bevölkert, aber destabilisiert wird. Für einen Einfluss der

Partikel-Stabilisator Wechselwirkung auf diesen Zustand spricht auch, dass sich die Einflüsse von Polarität und Viskosität auf die Lebensdauer dort weniger niederschlagen als in der reinen Stabilisatorlösung.

Diese Behauptungen lassen sich gut mit Abbildung 6-26 in Einklang bringen. Dort sind die Differenzen in der kurzen und langen Lebensdauer zwischen Vergleichs- und Partikelprobe für ein festes Dispersionsverhältnis dargestellt.



**Abb. 6-26** Differenzen in der Fluoreszenzlebensdauer zwischen Partikel- und reiner Stabilisatorlösung bei konstanter Dispersionsverdünnung von 1:4

Die kurze Lebensdauer bleibt eher unbeeinflusst von der Anwesenheit der Partikel in der Lösung, während sich die lange Lebensdauer durch die Partikelwechselwirkung stark verändert. Die Differenz in der langen Lebensdauer zwischen Vergleichs- und Partikellösung steigt von Butanol mit ca. 1 ns über Hexanol mit 2 ns bis zum Decanol mit im Schnitt 4 ns mit der Kettenlänge des Lösungsmittels sogar stark an. Dies deutet auf eine Zunahme der Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisatormolekül je langkettiger der Alkohol als Lösungsmittel. Kann die Fluoreszenzlebensdauer als Marker für die Stärke der Wechselwirkung angesehen werden, so sind die mit Diaminen stabilisierten ITO Partikel im langkettigen Decanol am besten stabilisiert.

Im nächsten Abschnitt werden die Ergebnisse der Anisotropiezerfallsanalyse vorgestellt.

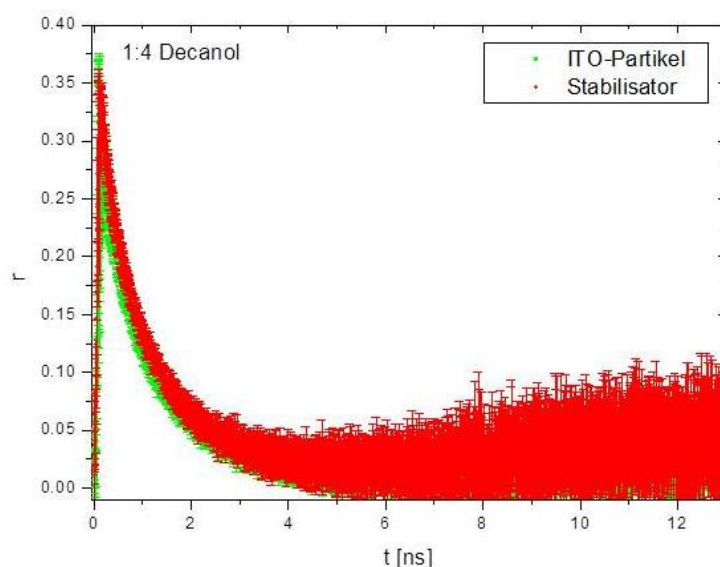
### Rotationskorrelationszeiten

Die Anisotropiezerfallskurven zeigen, wie auch im Falle der Stabilisierung mit *n*-Alkylaminen, monoexponentielles Verhalten. Dies war zu erwarten, da sich an der Art der Wechselwirkung zwischen Partikeloberfläche und Stabilisatormolekül durch die zusätzliche Aminogruppe am Stabilisatormolekül nicht viel ändern sollte. Dies Ergebnis kann



entsprechend ebenfalls wieder mit den Untersuchungen der Forschergruppen Greenough und Blanchard (2007), sowie Hay et al. (2003) an ähnlichen NBD-Chromophoren in Einklang gebracht werden. Die Einzelheiten dazu sind sie in Kapitel 3.4.2 und 6.3.1 nachzulesen. Als rotierende Einheit kann wieder die Dynamik eines an der langen Achse polarisierten prolaten Rotors angenommen werden.

In Abbildung 6-27 sind die mittleren Anisotropiezerfallskurven der mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Proben und der dazugehörigen Vergleichslösung in Decanol im Dispersionsverhältnis 1:4 dargestellt.



**Abb. 6-27** Anisotropiezerfallskurven für mit Ethylendiamin stabilisierte ITO-Partikel und ihrer Stabilisatorlösung im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1 in der Dispersionsverdünnung 1:4 in Decanol

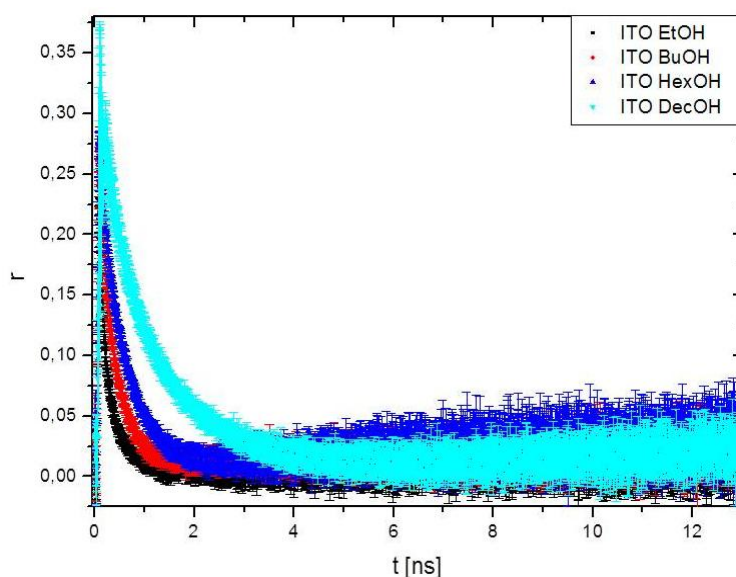
Vergleicht man diese mit Abbildung 6-15, in denen der Anisotropiezerfall der *n*-Alkylamine in Chloroform dargestellt ist, so fällt auf, dass hier die Anisotropie deutlich langsamer abfällt, die Rotationskorrelationszeit also länger ist. Dies ist nach dem Debye-Stokes-Einstein Modell (siehe Kapitel 2.4, Gleichung 2.32) auch zu erwarten gewesen. Aufgrund der höheren Viskosität des Decanols gegenüber der des Chloroforms wird das Stabilisatormolekül in seiner freien Bewegung gehemmt.

Vergleicht man die Abklingkurve des freien Stabilisators (rot) mit der der stabilisierten ITO-Partikel (grün) so sind diese nicht wirklich zu unterscheiden, wie auch bei den *n*-Alkylaminen im vorherigen Kapitel. Dies heißt also, dass die Wechselwirkung zwischen Partikeloberfläche und Stabilisatormolekül die Beweglichkeit des mit NBD-F gelabelten Stabilisatormoleküls nicht einschränkt, diese Wechselwirkung also eher schwacher Natur zu sein scheint.

Die gefitteten Rotationskorrelationszeiten ( $\theta$ ) liegen zwischen 800 und 850 ps, die Anfangsanisotropie ( $r_0$ ) im Bereich von 0,28-0,30, also deutlich länger bzw. höher als bei den



*n*-Alkylaminen in Chloroform. Setzt man den Wertebereich für die Anfangsanisotropie in Gleichung 2.29 aus Kapitel 2.4 ein und löst diese nach  $\beta$ , dem Winkel zwischen Anregungs- und Emissionsübergangsmoment auf, so erreicht man einen Winkelbereich von 34-35°. Da die Anisotropiekurven alle sehr ähnlich sind zu den in Abbildung 6-28 exemplarisch gezeigten, wird auf eine weitere Darstellung dieser verzichtet. Stattdessen erfolgt eine Darstellung der mittleren Anisotropiezerfallskurven mit Standardabweichung der ITO-Partikelproben in den einzelnen Alkoholen bei fester Dispersionsverdünnung von 1:4 um den Einfluss der Viskosität des Lösungsmittels zu zeigen.



**Abb. 6-28** Darstellung der mittleren Anisotropiezerfallskurven für die mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Partikel bei Dispersionsverdünnung 1:4 in den verschiedenen Alkoholen als Lösungsmittel

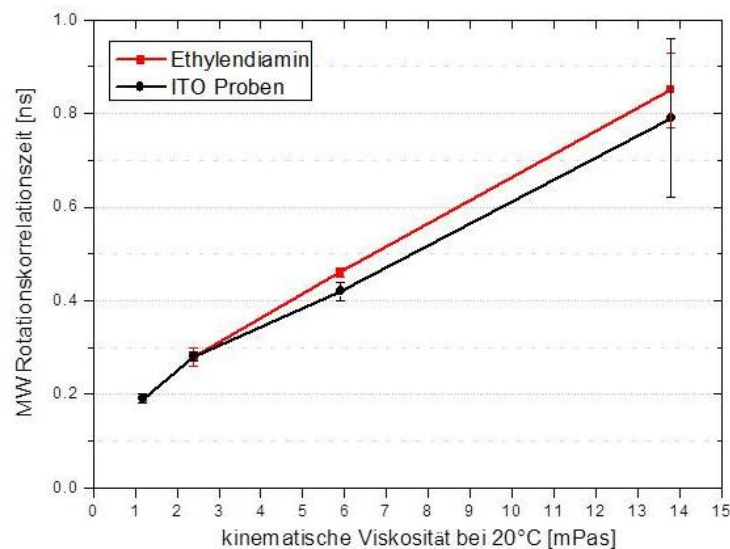
Dort lässt sich gut erkennen, dass die Anisotropie mit Zunahme der Kettenlänge des Alkohols langsamer abfällt, auch die Anfangsanisotropie steigt leicht mit Zunahme der Kettenlänge des Alkohols. Auch hier ist die verminderte Rotationsdiffusion aufgrund der Zunahme der Viskosität des Lösungsmittels gut zu erkennen. In Tabelle 6.9 sind die dazugehörigen Daten für die Anfangsanisotropie ( $r_0$ ) und die Rotationskorrelationszeit ( $\theta$ ) angegeben.

**Tab. 6.9** Fittergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Partikel bei Dispersionsverdünnung 1:4 in den verschiedenen Alkoholen als Lösungsmittel

ITO-Ethylendiamin	$r_0$	$\pm$	$\theta$ [ns]	$\pm$
Ethanol	0,213	0,016	0,19	0,01
Butanol	0,255	0,005	0,28	0,01
Hexanol	0,256	0,009	0,42	0,02
Decanol	0,283	0,004	0,79	0,17

Da sich das Abklingverhalten der Anisotropie der Partikelproben auch in den viskosen Lösungsmitteln nicht verändert hat, sondern monoexponentiell geblieben ist und auch keine Reste der initialen Anisotropie bei Pulsende zu beobachten sind, kann nur von einer sehr schwachen Wechselwirkung zwischen Stabilisator und Partikel ausgegangen werden. Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Untersuchungen aus Kapitel 6.4.1 sowie die der Projektpartner (siehe dafür Kapitel 6.2 bzw. [GRO2012a]).

In Abbildung 6-29 sind exemplarisch die Mittelwerte der gefitteten Rotationskorrelationszeiten für den Stabilisator Ethylendiamin und die dazugehörigen ITO-Partikelproben bei einer Dispersionsverdünnung von 1:4 gegen die Viskosität der Lösungsmittel aufgetragen (die entsprechenden Viskositäten sind in Tab. 6.8 aufgelistet).



**Abb. 6-29** Auftragung der mittleren Rotationskorrelationszeiten des reinen Stabilisators (Ethylendiamin) und der ITO-Partikelproben bei Dispersionsverdünnung 1:4 gegen die Viskosität der Lösungsmittel

Hier ist zum einen gut zu sehen, dass die Korrelationszeiten mit der Viskosität linear zunehmen, aber auch, dass die Korrelationszeiten in den Partikelproben zum Teil schwanken, da die Abweichung vom Mittelwert hier größer ist. Bei der Viskosität von 13,8 mPas, sprich in Decanol, schwankt  $\theta$  zum Beispiel zwischen 0,62 und 0,96 ns. Wobei in Decanol auch die Korrelationszeit des reinen Stabilisators einen größeren Fehler aufweist (0,78-0,95 ns) als in den weniger viskosen Lösungsmitteln. Wie in Abbildung 6-27 schon zu vermuten war, bestätigt die direkte Auftragung der gefitteten Ergebnisse der Rotationskorrelationszeitenanalyse aus den Anisotropiedaten, dass sich diese zwischen der reinen Stabilisatorlösung und den Partikellösungen nicht signifikant unterscheiden lassen. Im besten Fall fällt die Korrelationszeit in den Partikelproben minimal kürzer aus als in den Vergleichslösungen. Da diese aber durch eine Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator eher länger werden

sollte, kann aus diesen Ergebnissen nur geschlossen werden, dass diese Wechselwirkungen, wenn sie denn vor liegen, nur sehr schwach sein können, da die Rotation der Stabilisatormoleküle nicht behindert wird.

Mit Hilfe der Ausweitung des Messsystems auf die mit Diaminen stabilisierten ITO-Partikel, um auch vikosere Lösungsmittel verwenden zu können, konnten also keine zusätzlichen Informationen erhalten werden, die für die Interpretation der Art der Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisator verwendet werden können. Da sich die zweite Lebensdauer in den Partikellösungen aber deutlich von der in der Vergleichslösung unterscheidet, kann man davon ausgehen, dass es eine Wechselwirkung geben muss, die sich aber nicht auf den Anisotropiezerfall auswirkt und daher von schwacher Natur sein muss. Eine Entscheidung, ob sich die Stabilisatormoleküle eher horizontal oder vertikal an die Partikeloberfläche anlagern (siehe Abb. 6-16) kann nicht sicher getroffen werden.

Es konnte aber gezeigt werden, dass das Debye-Stokes-Einstein Modell anwendbar ist.

## 6.5 Anisotropiemessungen an $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikeln

Da am ITO-Partikelsystem nur Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer, die zum Teil sehr gering waren, zwischen den reinen Stabilisatorlösungen und den Partikelsipersionen festgestellt wurden und keine Unterschiede in den Anisotropiezerfallskurven, soll hier der Schwerpunkt noch einmal auf ein anderes Partikelsystem gelegt werden.

Denn noch ist unklar, ob diese geringen Unterschiede im ITO-Partikelsystem tatsächlich auf schwache Wechselwirkungen zurückzuführen sind, oder aber, ob die Wechselwirkungen zwischen der Partikeloberfläche und den Stabilisatormolekülen keinen Einfluss auf das Fluoreszenz- und Anisotropieverhalten zeigen und diese fluoreszenzmikroskopische Methode deshalb nicht geeignet ist, um diese Art der Wechselwirkung anzuzeigen.

Das  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem eignet sich gut dafür, da dort die Wechselwirkungen nach bisherigen Untersuchungen deutlich stärker sind (vgl. Kapitel 6.2).

### 6.5.1 Aminocarbonsäuren

In diesem Abschnitt werden zunächst nacheinander die Ergebnisse der verschiedenen Stabilisator/Partikel-Verhältnisse (0,2:1, 0,1:1 und 0,02:1) der beiden bei der Partikelstabilisierung eingesetzten Stabilisatoren mit unterschiedlicher Kettenlänge (6-Aminohexansäure, 12-Aminododekansäure) vorgestellt und anschließend verglichen.

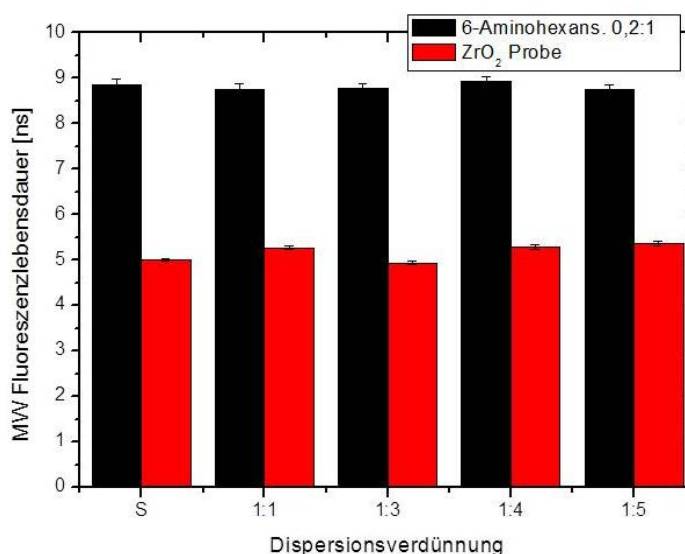
Dabei wird mit den mit 6-Aminohexansäure stabilisierten Partikelchargen begonnen.

### 6-Aminohexansäure

#### **Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1:**

Das Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1 bezieht sich auf das molare Verhältnis zwischen Stabilisatormolekül und Metalloxideinheit aus der Partikelsynthese und nicht auf die molare Masse eines einzelnen Partikels, siehe dazu Kapitel 6.3, Tabelle 6.4. Ein Verhältnis von 0,2:1 bedeutet, dass ein Partikel von ca. 360 Stabilisatormolekülen stabilisiert wird. Dies ist deutlich weniger als im Falle der ITO-Partikel, die je nach Verhältnis mit 4000-8500 Stabilisatoren pro Partikel stabilisiert werden.

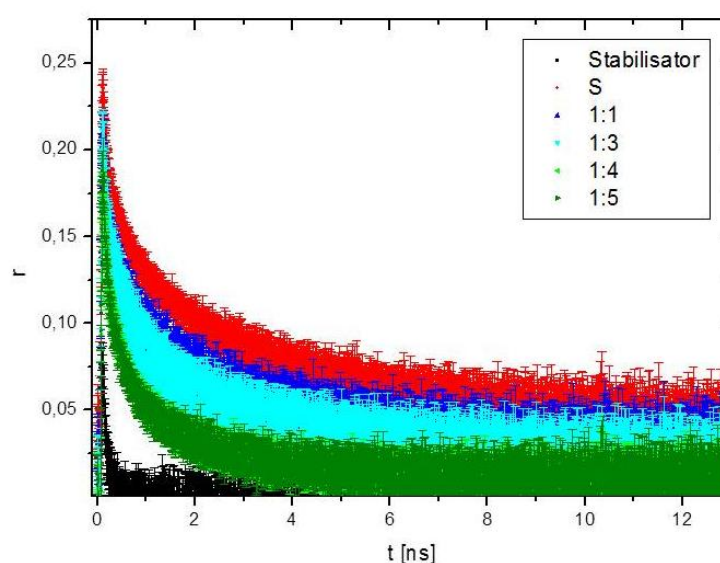
Die aus den Messungen erhaltenen Fluoreszenzabklingkurven zeigen monoexponentielles Abklingverhalten. In Abbildung 6-30 ist das Ergebnis der Fluoreszenzlebensdaueranalyse dargestellt. Darin ist gut zu sehen, dass sich die Lebensdauern der reinen Stabilisatorlösungen deutlich von denen der Partikellösungen unterscheiden.



**Abb. 6-30** Fluoreszenzlebensdauern der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,2:1 stabilisierten Proben

Während die Lebensdauer in den Stabilisatorlösungen über den gesamten Bereich der Dispersionsverdünnung konstant knapp unterhalb von 9 ns liegt, so sinkt die Lebensdauer in den Partikeldispersionen auf ca. 5 ns ab und bleibt ebenfalls über den gesamten Konzentrationsbereich konstant. Effekte wie das Quenching oder Energietransfer können somit ausgeschlossen werden. Vielmehr, scheint es eine Wechselwirkung zwischen

Stabilisator und Partikeloberfläche zu geben, die dazu führt, dass der Grundzustand stabilisiert, bzw. der angeregte Zustand schneller entvölkert wird. Da die Lebensdauer auf fast die Hälfte sinkt, im Vergleich zur reinen Stabilisatorlösung, kann davon ausgegangen werden, dass diese Wechselwirkungen relativ stark sind. Aus den Ergebnissen von NMR Messungen haben Grote et al. (2012) postuliert, dass der Stabilisator eine kovalente Bindung zur Partikeloberfläche ausbildet (siehe Kapitel 6.2, bzw. [GRO2012b]) für umfangreichere Informationen). Um dies zu bestätigen, sollten die Anisotropiedaten eine eingeschränkte Bewegung der an die Partikeloberfläche angebundenen Stabilisatormoleküle anzeigen. Abbildung 6-31 zeigt die dazugehörigen Anisotropiezerfallskurven.



**Abb. 6-31** Anisotropiezerfallskurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,2:1 stabilisierten Proben

Hier unterscheiden sich die Abklingkurven der Partikeldispersionen tatsächlich deutlich von der des reinen Stabilisators. Dies ist neben dem Ergebnis der Fluoreszenzlebensdaueranalyse ein zweiter guter Hinweis darauf, dass die Wechselwirkungen beim  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem anderer Natur sein müssen als in dem ITO-Partikelsystem (Kapitel 6.3.1), sie müssen stärker sein.

Die initiale Anisotropie ( $r_0$ ) ist in den Partikeldispersionen deutlich höher als in der Vergleichslösung. Da dies nur in den Partikelproben der Fall ist, kann die Wechselwirkung mit der Partikeloberfläche dafür verantwortlich gemacht werden. In der reinen Stabilisatorlösung besitzt  $r_0$  den Wert  $\sim 0,08$ . Dieser passt sehr gut zu den Werten für  $r_0$  aus den Messungen mit den *n*-Alkylaminen stabilisierten ITO-Partikeln, nur dass dort nicht nur die reinen Stabilisatorlösungen in diesem Bereich lagen, sondern auch die nur schwach mit den *n*-Alkylaminen wechselwirkenden ITO-Partikeldispersionen. Bei der Stabilisierung mit

den Diaminen wurden vergleichbare initiale Anisotropien erhalten (für Vergleichs- und Partikeldispersionen). Diese beruhen jedoch auf der höheren Viskosität der als Lösungsmittel eingesetzten Alkohole. Die  $\text{ZrO}_2$  Partikel sind jedoch in dem niedrigviskosen Chloroform stabilisiert und dispergiert (Tab. 4.5 in Kapitel 4.3.2).

In Tabelle 6.10 sind die Ergebnisse der Fitanalyse der in Abbildung 6-31 gezeigten Anisotropiezerfallskurven aufgelistet. Die Auswertung erfolgte nach Gleichung 6-1 in Anlehnung an das in Kapitel 2.4 beschriebene Modell des nicht-assoziativen Anisotropiezerfalls. Gleichung 6-1 ist dabei lediglich um einen zweiten Exponentialterm erweitert worden.

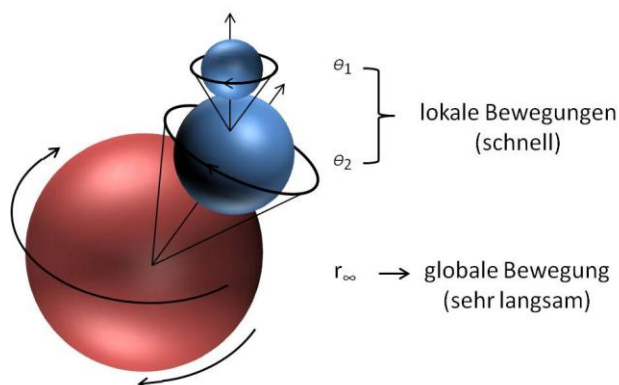
$$r(t) = (r_0 - r_\infty) \left[ g_1 e^{-\frac{t}{\theta_1}} + g_2 e^{-\frac{t}{\theta_2}} \right] + r_\infty \quad (6-1)$$

**Tab. 6.10** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,2:1 stabilisierten Proben

Probe	$g_1 \pm$ [%]	$\theta_1 \pm$ [ns]	$g_2 \pm$ [%]	$\theta_2 \pm$ [ns]	$g_\infty \pm$ [%]	$r_0 \pm$
<b>S</b>	38 1	0,48 0,01	45 1	4,13 0,20	17 0	0,223 0,003
<b>1:1</b>	44 3	0,46 0,04	42 2	3,59 0,26	14 1	0,193 0,011
<b>1:3</b>	45 18	0,46 0,05	44 15	2,95 0,42	11 4	0,179 0,038
<b>1:4</b>	63 2	0,37 0,02	32 2	2,38 0,12	5 1	0,175 0,005
<b>1:5</b>	65 2	0,37 0,04	30 2	2,46 0,25	5 1	0,174 0,009

Die Fitanalyse zeigt zum einen die absoluten, gefitteten Werte für das eben bereits diskutierte  $r_0$ , wie auch die gefitteten Rotationskorrelationszeiten und das Vorliegen einer Restanisotropie ( $r_\infty$ ), denn die Anisotropie ist zum Pulsende in den Partikeldispersionen noch nicht auf 0 abgesunken. Es ist gut zu erkennen, dass das  $r_0$  mit Zunahme der Verdünnung der Partikeldispersionen leicht sinkt, d.h. die Stabilisatormoleküle können mit Abnahme der Partikelkonzentration in der Lösung wieder leichter diffundieren zwischen dem Prozess der Anregung und Emission. Das Abklingverhalten der zeitaufgelösten Anisotropie ist für die Partikellösungen biexponentiell. Da das der reinen Stabilisatorlösungen aber monoexponentiell ist (~130 ps), kann das biexponentielle Verhalten der Partikel-Stabilisator Wechselwirkung zugeschrieben werden. Das gelabelte Stabilisatormolekül (NBDAHA) agiert weiterhin wie ein prolater Rotationsellipsoid, wie auch die anderen Stabilisatormoleküle in

den vorangegangenen Messungen am ITO-System und die ähnlichen NBD-Chromophore in den bereits mehrfach genannten Untersuchungen der anderen Forscher, Greenough und Blanchard (2007) und Hay et al. (2010). Allerdings wird dieser durch die Verbindung zur Partikeloberfläche in seiner freien Bewegung eingeschränkt, wodurch zwei Rotationskorrelationszeiten resultieren. Es liegt ein sogenannter nicht-assoziierter Anisotropiezerfall vor. Die kurze Rotationszeit könnte dabei die Rotation der NBD-Gruppe anzeigen, welche sich am Ende des Stabilisatormoleküls befindet. Und die zweite, längere Rotationskorrelationszeit könnte die Bewegung des gesamten (mit NBD-F gelabelten und an den Partikel gebundenen) Stabilisatormoleküls beschreiben. Da die Anisotropie nicht wieder ganz auf Null zurück sinkt, könnte es zusätzlich noch eine sehr lange Rotation geben, die darauf hinweist, dass das Stabilisatormolekül im Vergleich zu seiner eigenen Größe, an etwas sehr großem gebunden ist, wie zum Beispiel an einem  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikel und in seiner Bewegung eingeschränkt wird. Abbildung 6-32 zeigt als Skizze, wie die beiden lokalen Bewegungen (NBD-Gruppe und Stabilisatormolekül) und die lange, globale Bewegung zu verstehen sind.



**Abb. 6-32** Skizze des vorliegenden assoziierten Anisotropiezerfalls mit zwei schnellen, lokalen Korrelationszeiten und einer globalen, langen Korrelationszeit (nach: [WEI2010])

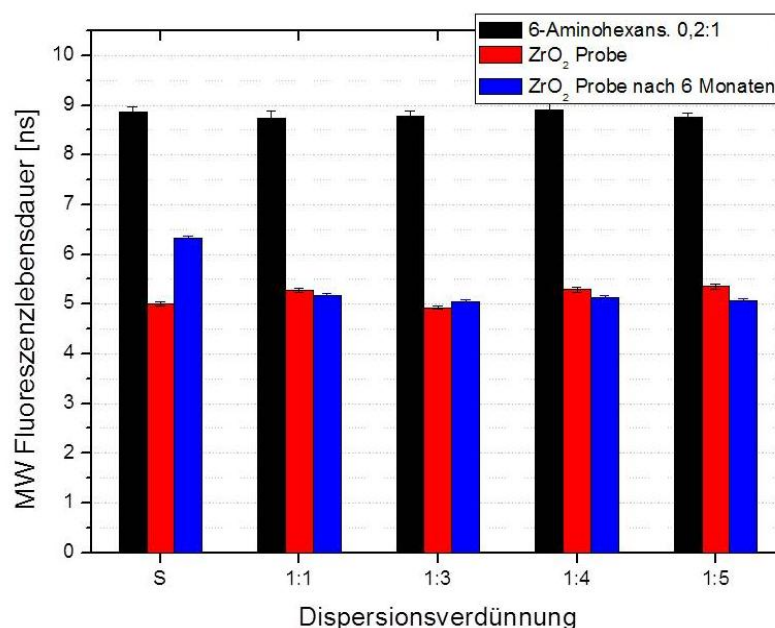
Der Anteil der kurzen Rotationskorrelationszeit nimmt mit der Dispersionsverdünnung zu. Macht er in der unverdünnten Partikellösung (S) nur 38 % aus, steigt er in der Verdünnung 1:5 bis auf 65 % an. Zusätzlich sinkt der absolute Wert dieser Korrelationszeit von 0,48 ns auf 0,37 ns. Dies könnte sich dadurch erklären lassen, dass die zu Beginn hohe Partikelkonzentration in der Dispersion die Bewegung der endständigen NBD-Gruppe behindert, weil die einzelnen Partikel zu dicht beisammen sind. Dafür spricht auch die Restanisotropie, die in der unverdünnten Dispersion bei 17 % ( $g_\infty$ ) liegt und mit Zunahme der Dispersionsverdünnung auf nur noch 5 % sinkt.

Der Abstand zwischen den einzelnen Partikeln scheint mit Zunahme der Verdünnung größer zu werden und sich in den Anisotropiedaten widerzuspiegeln. Vorstellbar wäre auch, dass bei

hoher Partikelkonzentration zunächst auch noch agglomerierte Partikel vorliegen und die Primärpartikelgröße erst mit größerer Verdünnung erzielt wird.

Diese Interpretation der Messdaten wird gut durch die Untersuchungen von Loura und Ramalho (2007) zur Moleküldynamik und dem Fluoreszenzverhalten von Doppelmembranen in denen sogenannte Lipidanaloga (C6-NBD-PC und C12-NBD-PC) eingebettet sind unterstützt. Eine Beschreibung dazu erfolgte bereits in Kapitel 3.4.2. Die von den Forschern erhaltenen Ergebnisse ihrer Anisotropiezerfallsanalyse sind in Tabelle 3.3 aufgelistet. Die Rotationszeiten sind dort entsprechend noch etwas länger als hier bei den Nanopartikeln, da die Chromophore dort tief in die Membran eingebettet sind.

Anhand dieses Stabilisator/Partikel-Verhältnisses wurde für das  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem auch einmal exemplarisch die Haltbarkeit, bzw. die Stabilität der Partikelproben über Zeit untersucht. Dazu wurde die gleiche Partikelcharge nach 6-monatiger Lagerung im Kühlschrank erneut mit NBD-F gelabelt und untersucht. Die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdauern sind in der nachfolgenden Abbildung (Abb. 6-33) zu sehen, die der Anisotropiezerfallsanalyse in der nachfolgenden Tabelle (Tab. 6.11).



**Abb. 6-33** Fluoreszenzlebensdauern der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,2:1 stabilisierten Partikel nach Herstellung und nach 6-monatiger Lagerung zur Überprüfung der Haltbarkeit



**Tab. 6.11** Fitergebnisse des Anisotropiezerfalls der Partikelproben nach 6-monatiger Lagerung

<b>Probe</b>	$g_1 \pm$ %	$\theta_1 \pm$ ns	$g_2 \pm$ %	$\theta_2 \pm$ ns	$g_\infty \pm$ %	$r_0 \pm$
S	36 2	0,42 0,06	40 1	5,04 0,31	25 4	0,19 0,018
1:1	47 4	0,42 0,02	40 1	3,31 0,23	13 3	0,224 0,014
1:3	58 1	0,40 0,04	35 0	2,77 0,12	7 1	0,201 0,008
1:4	56 2	0,39 0,04	37 2	2,73 0,20	7 1	0,198 0,005
1:5	60 1	0,37 0,01	34 1	2,47 0,10	7 0	0,192 0,003

Die Ergebnisse passen ziemlich gut zu den 6 Monate zuvor ermittelten. Die Partikelproben sind also über einen längeren Zeitraum stabil. Dies zeigt sich darin, dass die Werte der Rotationskorrelationszeiten und der Restanisotropie den zuvor bestimmten sehr ähneln und auch die relativen Anteile vergleichbar sind. Zusätzlich weisen die Daten innerhalb der Dispersionsverdünnungen die gleichen Trends auf, wodurch die zuvor gemachten Aussagen noch einmal bestätigt werden. Die ermittelten Fluoreszenzlebensdauern (Abb. 6-33) sind ebenfalls vergleichbar.

Die Auflistung der Ergebnisse der weiteren vermessenen Chargen würde an dieser Stelle zu viel Platz einnehmen. Deshalb erfolgt ihre Darstellung im Anhang (Kapitel 9.3). Sie zeigen, dass der angenommene nicht-assozierte Anisotropiezerfall mit den drei zuvor erläuterten Anteilen an der Rotationskorrelationszeit stimmig ist. Lediglich die relativen Anteile dieser drei Komponenten ( $\theta_1$ ,  $\theta_2$ ,  $r_\infty$ ) unterscheiden sich zum Teil. Dies zeigt eine normale, und zu erwarten gewesene Varianz in der Probenzusammensetzung der einzelnen Chargen. So sind manchmal die Restanisotropien größer, was dafür spricht, dass die Partikelgrößenverteilung in den Chargen nicht immer homogen ist, sondern auch Chargen vorkommen, in denen die Partikel nicht so homogen stabilisiert sind und auch kleinere Agglomerate vorzufinden sind. Auch die in Einzelfällen größere Abweichung vom Mittelwert ( $\pm$  Angabe in den Tabellen) deutet auf eine manchmal nicht so homogene Partikelgrößenverteilung wie in der hier dargestellten Charge (Tab. 6.10 und 6.11) hin.

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen sind sehr sensitiv und zeigen deshalb schon kleine Änderungen in der Umgebung des Fluorophors an. Diese Sensitivität eröffnet neben der Bestimmung der Stärke der Wechselwirkung zwischen den Stabilisatoren und der Partikeloberfläche vielleicht auch die Möglichkeit, die Homogenität einer Partikellösung mit

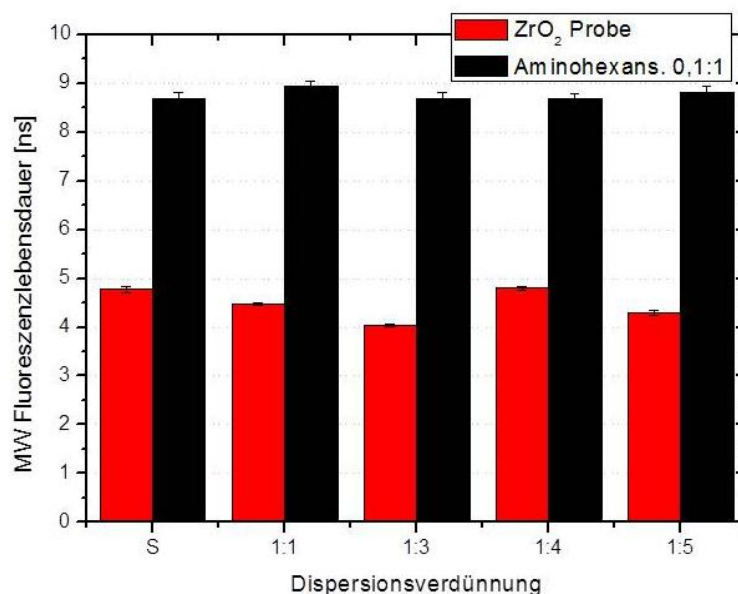
zu untersuchen und somit etwas über die Qualität der hergestellten Partikeldispersionen auszusagen.

Im nächsten Abschnitt erfolgt die Diskussion der Ergebnisse des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses 0,1:1. Ziel ist es, die gewonnen Daten auf einen Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses zu untersuchen.

### **Stabilisator/Partikelverhältnis 0,1:1:**

Bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,1:1 kommen in etwa 180 Stabilisatormoleküle auf einen Partikel des  $\text{ZrO}_2$  Systems. Das sind nur halb so viele wie beim vorangegangenen Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,2:1. Die Darstellung der Ergebnisse wird zeigen, ob dadurch andere Arten der Wechselwirkung zwischen Stabilisator und Partikel in den Fluoreszenzmessungen zu erkennen sind.

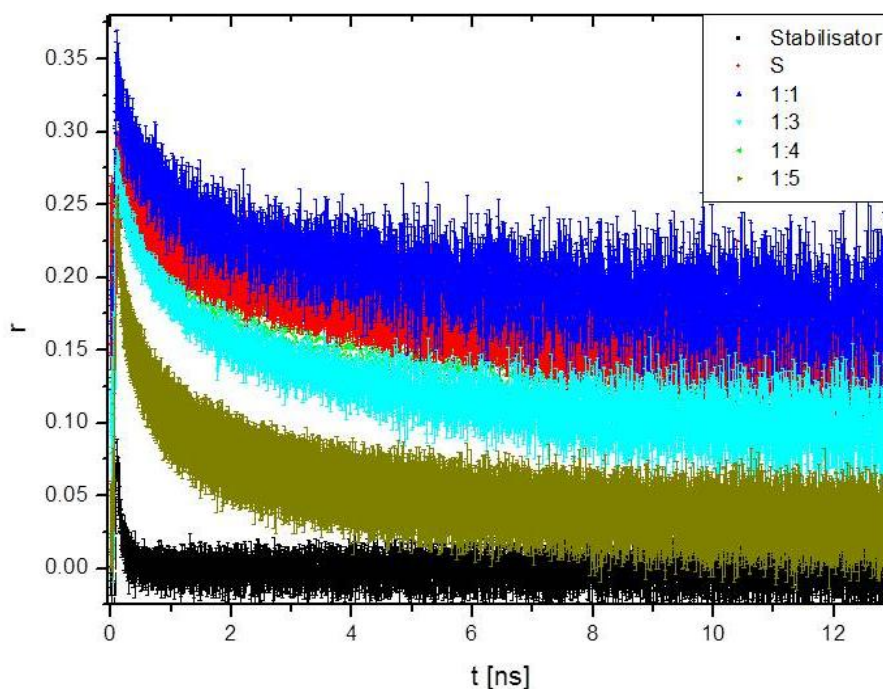
Die in Abbildung 6-34 dargestellten Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdaueranalyse zeigen keinen Einfluss der beiden unterschiedlichen Verhältnisse auf die Fluoreszenzlebensdauer an, da diese ziemlich genau denen beim Verhältnis 0,2:1 ermittelten entsprechen, siehe Abb. 6.30.



**Abb. 6-34** Fluoreszenzlebensdauern der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,1:1 stabilisierten Proben

Wenn die Differenz der Lebensdauer zwischen reiner Stabilisatorlösung und den Partikellösungen tatsächlich als Marker für die Stärke der Wechselwirkungen angesehen werden kann, und so sieht es nach den Ergebnissen aus den Kapiteln 6.4.1 und 6.4.2 und diesem bisher aus - so ändert sich zwischen diesen beiden Stabilisator/Partikel-Verhältnissen nichts an der Stärke der Wechselwirkung zwischen Ligand und Partikel.

Ob das Stabilisator/Partikel-Verhältnis einen Einfluss auf die Rotationsdynamik des NBD-Chromophors hat, zeigt Abbildung 6-35.



**Abb. 6-35** Anisotropiezerfallskurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0,1:1 stabilisierten Proben

Auch hier ist ähnlich wie in Abbildung 6-31 zu sehen, dass der Anisotropiezerfall in den Partikelproben deutlich langsamer ist als in der Stabilisatorlösung. Mit Zunahme der Dispersionsverdünnung sinkt dieser schneller ab, zeigt jedoch in den Partikellösungen wieder eine Restanisotropie an. Der Anisotropiezerfall ist also allgemein gut mit in Abbildung 6-31 für das Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1 zu vergleichen. Es fällt lediglich auf, dass die lange Rotationskorrelationszeit  $\theta_2$ , wie auch das  $r_\infty$  eine größere Schwankungsbreite, bzw. statistische Abweichung vom Mittelwert aufweist. Die Zerfallskurven für die Dispersionsverdünnungen S, 1:1, 1:3 liegen mit ihren breiten Schwankungen fast übereinander und sind nicht gut zu unterscheiden. In den gefitteten Anisotropiedaten in Tabelle 6.12 wird dies deutlicher.

**Tab. 6.12** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,1:1 stabilisierten Proben

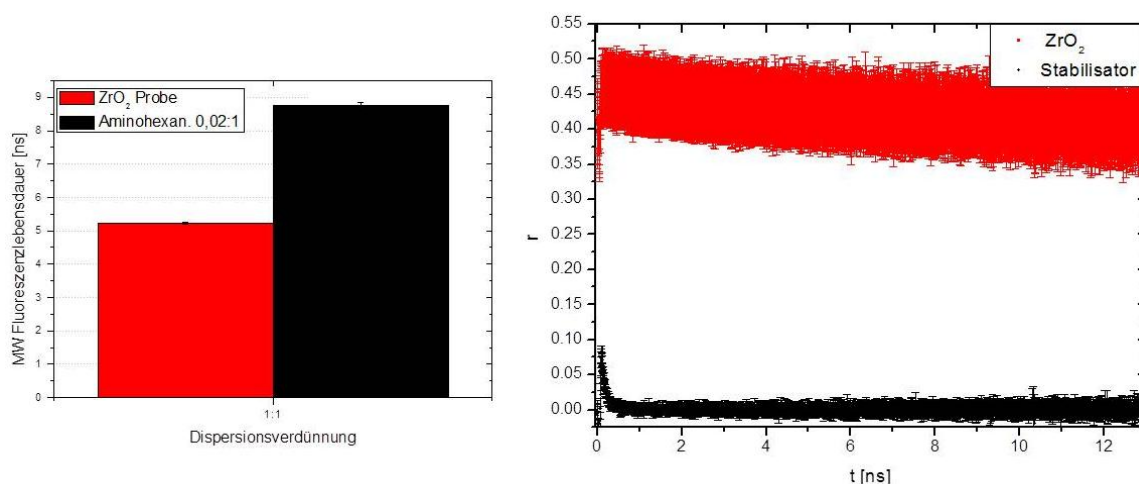
Probe	$g_1 \pm$ %	$\theta_1 \pm$ ns	$g_2 \pm$ %	$\theta_2 \pm$ ns	$g_\infty \pm$ %	$r_0 \pm$
S	17 1	0,67 0,07	38 2	7,56 0,92	45 3	0,279 0,021
1:1	45 2	0,45 0,17	39 2	3,44 0,30	15 3	0,246 0,011
1:3	42 13	0,55 0,10	42 12	3,59 0,71	16 25	0,244 0,05
1:4	42 17	0,55 0,10	39 18	4,71 0,74	33 10	0,287 0,063
1:5	52 7	0,49 0,03	35 3	3,45 0,44	13 5	0,224 0,011

Das  $\theta_2$  ist hier länger als beim Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1 und nimmt auch nicht so gleichmäßig ab mit Zunahme der Partikelverdünnung. Die Schwankungen am absoluten Wert sind allerdings mit 0,3-0,92 ns auch viel größer. Betrachtet man die Werte für die Restanisotropie so sind diese in diesem Verhältnis 0,1:1 auch höher und breiter verteilt. Gleiches Bild ergibt sich für die initiale Anisotropie ( $r_0$ ). Die Werte sind etwas größer, besitzen aber auch einen größeren, statistischen Fehler, so dass sie am Ende in der gleichen Größenordnung angesiedelt werden müssen. Prinzipiell scheint es also so zu sein, dass die gleiche Art der Wechselwirkung vorliegt, wie im Fall der Stabilisierung im Verhältnis 0,2:1 mit doppelt so vielen Stabilisatormolekülen pro Partikel, hier die Dispersionen aber nicht so homogen sind.

Es erweckt den Anschein, dass die Partikelgrößenverteilung hier breiter ist. Es gibt danach Primärpartikel, aber auch einige kleinere Agglomerate. Um herauszufinden, ob dies auf ein niedrigeres Stabilisator/Partikel-Verhältnisses zurück zuführen ist, hätten auch bei diesem Verhältnis mehrere Chargen vermessen werden müssen. Dies war leider nicht möglich, so dass nicht geklärt werden kann, ob es sich bei dem Effekt um die normale Schwankungsbreite von Charge zu Charge des gleichen Stabilisator-Partikel-Verhältnisses handelt, die es ja nach den Untersuchungen mehrerer Chargen am Verhältnis 0,2:1 durchaus gibt, oder aber ob es sich um einen wirklichen Effekt des niedrigeren Stabailisator/Partikel-Verhältnisses handelt, welches nicht mehr in der Lage ist, die Partikel in Primärpartikelgröße zu stabilisieren (vgl. DLS Messungen im Anhang, Kapitel 9.3). Vielleicht können die Ergebnisse für das nachfolgende Stabilisator/Partikel-Verhältnis Aufschluss geben.

### Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,02:1:

Bei diesem Stabilisator/Partikel-Verhältnis kommen auf einen Nanopartikel nur noch 36 Moleküle des Stabilisators in der Dispersion. Wie sich diese geringe Anzahl auf die Stabilisierung auswirkt, zeigt Abbildung 6-36. Dort sind zunächst einmal die Fluoreszenzlebensdauer- und die Anisotropiezerfallsanalyse für eine Charge bei Dispersionsverdünnung von 1:1 dargestellt.



**Abb. 6-36** Fluoreszenzlebensdauer (links) und Anisotropiezerfall (rechts) der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben bei Dispersionsverdünnung 1:1

Die Fluoreszenzlebensdauern entsprechen wieder denen in den vorangestellten Untersuchungen bei den Stabilisator/Partikel-Verhältnissen 0,2:1 und 0,1:1. Die Fluoreszenzlebensdauer der Partikellösungen unterscheidet sich deutlich von der in der Stabilisatorlösung. Dies spricht für eine starke Wechselwirkung zwischen den Stabilisatormolekülen und der Partikeloberfläche.

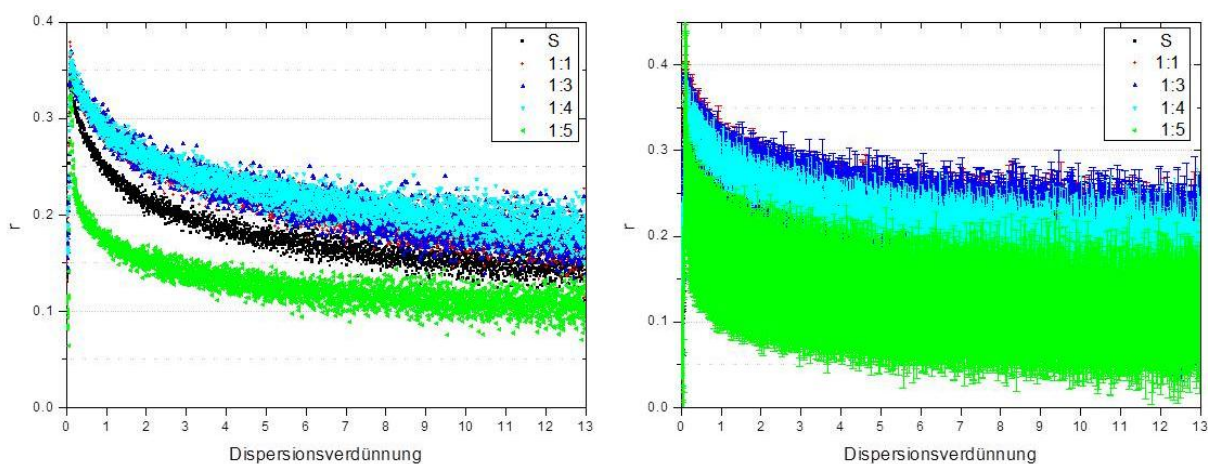
Der Anisotropiezerfall zeigt ein etwas anderes Bild als in den vorangegangenen Ergebnissen. Hier ist der Anisotropiezerfall monoexponentiell. Die initiale Anisotropie ( $r_0$ ) mit einem mittleren Wert von 0,45 etwas erhöht und die Restanisotropie ( $r_\infty$ ) ist mit einem relativen Anteil ( $g_\infty$ ) von 84 % ebenfalls stärker ausgeprägt als bei den höheren Stabilisator/Partikel-Verhältnissen. Tabelle 6.13 fasst die Ergebnisse der Anisotropiezerfallsanalyse zusammen.

**Tab. 6.13** Fitergebnisse des Anisotropiezerfalls der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben bei Dispersionsverdünnung 1:1

Probe	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_\infty$	$\pm$	$r_0$	$\pm$
	%		ns		%			
1:1	16	2	11,53	2,98	84	2	0,452	0,041

Die erhaltene Rotationskorrelationszeit ( $\theta_1$ ) ist mit einem Mittelwert von 11,53 ns ebenso stark erhöht. Alles zusammen erweckt den Anschein, als das dieses niedrige Stabilisator/Partikel-Verhältnis nicht mehr ausreichend ist, um die Nanopartikel vollständig gegenüber der Agglomeration zu schützen und hier größere Agglomerate in der Dispersion vor liegen. Die Beweglichkeit der NBD-Gruppe ist so stark eingeschränkt, dass nur noch eine Rotationskorrelationszeit aufgelöst werden kann. Um diesen Sachverhalt mit höherer statistischer Sicherheit zu klären, wurden weitere Chargen vermessen. Dabei zeigt die Fluoreszenzlebensdauer aller 3 Chargen für alle Dispersionsverdünnungen wieder ein einheitliches Bild. In der reinen Stabilisatorlösung beträgt sie annähernd 9 ns, während sie in den Partikeldispersionen auf ca. 4 ns absinkt. Eine graphische Darstellung ist im Anhang zu finden (Kapitel 9.3).

Die nachfolgende Abbildung und Tabelle zeigen die Ergebnisse der Anisotropiezerfallsanalyse von Charge 2. Die entsprechenden Daten für Charge 3 sind ebenso im Anhang dargestellt.



**Abb. 6-37** Anisotropiezerfallskurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben aus Charge 3: Mittelwerte der Einzelmessungen (links), Mittelwerte mit Standardabweichung (rechts)

**Tab. 6.14** Fitergebnisse für den Anisotropiezerfall von den mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben aus Charge 3

<b>Probe</b>	$g_1$ ± %	$\theta_1$ ± ns	$g_2$ ± %	$\theta_2$ ± ns	$g_\infty$ ± %	$r_0$ ±
<b>S</b>	28 1	0,65 0,03	32 2	4,83 0,31	40 2	0,342 0,006
<b>1:1</b>	24 2	0,80 0,16	39 7	8,96 3,42	38 9	0,363 0,024
<b>1:3</b>	19 1	0,74 0,04	38 11	6,75 0,63	43 11	0,357 0,025
<b>1:4</b>	22 1	0,80 0,03	32 3	7,23 0,67	47 3	0,359 0,016
<b>1:5</b>	31 8	0,51 0,19	31 3	4,25 1,33	39 7	0,258 0,058

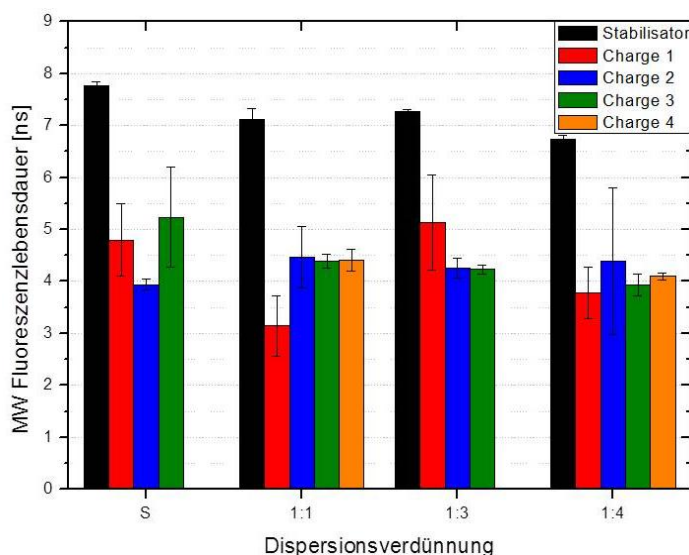
Hier fällt als erstes auf, dass die Anisotropiezerfallskurven wieder biexponentiell gefittet werden können. Nichtsdestotrotz deuten die erhaltenen Daten auf eine schlechtere Beweglichkeit des NBD-Chromophors, bzw. Stabilisators an der Partikeloberfläche hin. Beide Korrelationszeiten sind im gesamten Dispersionsverdünnungsbereich größtenteils länger als in den höheren Stabilisator/Partikel-Verhältnissen, was andeutet, dass die Beweglichkeit der NBD-Gruppe am Ende des Stabilisatormoleküls, wie auch das Stabilisatormolekül selbst in ihrer Beweglichkeit leicht gehindert sind. Zusammen mit dem hohen Anteil ( $g_\infty$ ) an Restanisotropie deutet sich, wie bei Charge 1 bereits vermutet, an, dass die Partikel hier zum Teil in kleineren Agglomeraten vorliegen. Allgemein liegen hier größere Schwankungen innerhalb der Messungen einer Dispersionsverdünnung vor. Um dies deutlich zu machen, sind in Abbildung 6-37 auf der linken Seite nur die Mittelwerte der Anisotropiezerfallskurven aufgetragen, während auf der rechten Seite deren Standardabweichung hinzu kommt. Es ist gut zu sehen, dass die Kurven für die verschiedenen Dispersionsverdünnungen unter Berücksichtigung der Abweichung vom Mittelwert sehr viel breiter werden und sich zum Teil nicht mehr voneinander unterscheiden lassen. Die Partikelgrößenverteilung scheint bei diesem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von heterogener Natur zu sein und deutlich oberhalb der Primärpartikelgröße von 5 nm zu liegen.

Um zu überprüfen ob in den Fluoreszenzuntersuchungen Hinweise auf einen Einfluss der Kettenlänge des Stabilisators auf die Partikelstabilisierung gefunden werden können, werden als nächstes die Ergebnisse der Stabilisierung mit 12-Aminododecansäure gezeigt.

## 12-Aminododecansäure

### Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1:

Die Abbildung 6-38 zeigt zunächst die Ergebnisse der Fluoreszenzlebensdaueranalyse für die Stabilisator- und Partikellösungen der vermessenen Chargen.

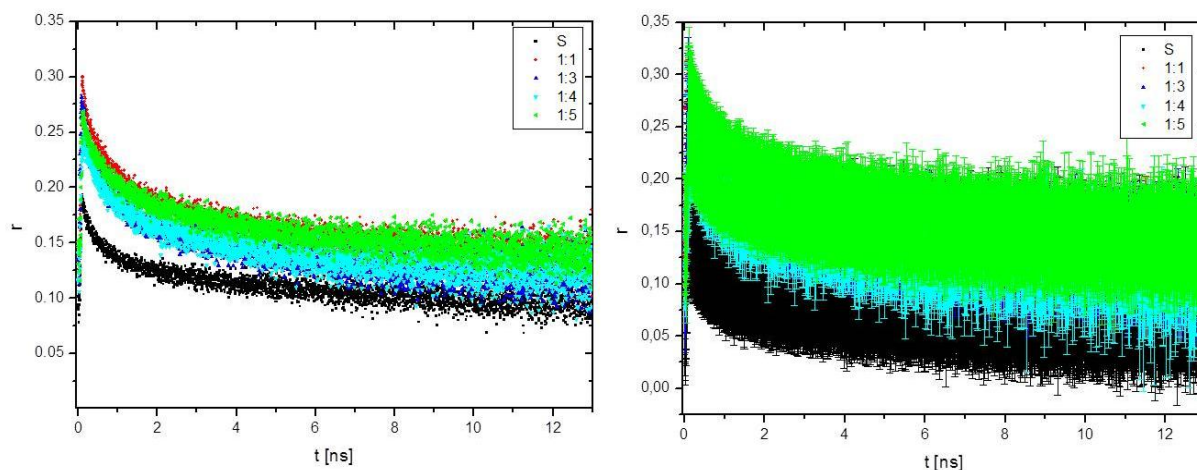


**Abb. 6-38** Fluoreszenzlebensdauer der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 2:1 stabilisierten Proben verschiedener Chargen

Auch bei der Stabilisierung mit der längeren Aminocarbonsäure unterscheiden sich, wie zu erwarten war, die Fluoreszenzlebensdauern der Partikeldispersionen deutlich von denen der reinen Stabilisatorlösungen. So liegen die Lebensdauern je nach Dispersionsverdünnung in den Stabilisatorlösungen zwischen 7 und 8 ns, die der Partikeldispersionen zwischen 3 und 5 ns. Auffällig ist hier, dass im Vergleich zu den Messungen an den mit der kürzeren Aminocarbonsäure stabilisierten Partikeln, die Lebensdauer in den Partikellösungen zum Teil um 2-3 ns schwankt. Dies könnte man als Hinweis auffassen, dass Partikel im Messvolumen vorhanden gewesen sein könnten, die nicht so stark stabilisiert waren, oder freie Stabilisatormoleküle, die dann die Lebensdauer in die Richtung der Größenordnung der Lebensdauer in der reinen Stabilisatorlösung verschoben haben.

In Abbildung 6-39 sind die Anisotropiezerfallskurven für Charge 3 abgebildet. Wegen der großen statistischen Abweichung vom Mittelwert auf der linken Seite zunächst wieder nur die Mittelwerte und auf der rechten Seite dann inklusive Standardabweichung.





**Abb. 6-39** Anisotropiezerfallskurven der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 2:1 stabilisierten Proben aus Charge 3: Mittelwerte der Einzelmessungen (links), Mittelwerte der Einzelmessungen mit Standardabweichung (rechts)

Im Prinzip zeigt sich hier ein ähnliches Bild wie bei den Anisotropiedaten der Stabilisierung mit 6-Aminohexansäure im entsprechenden Stabilisator/Partikel-Verhältnis in Abbildung 6.31. Unter genauer Betrachtung fällt auf, dass die stationären Anisotropien ( $r_0$ ) bei der Stabilisierung mit dem längeren Stabilisatormolekül höher sind als bei der Stabilisierung mit dem kurzkettigen Stabilisatormolekül. Die stationäre Anisotropie liegt hier in einem Bereich von 0,26-0,29 (siehe Tab. 6-15), während sie für die mit 6-Aminohexansäure stabilisierten Partikel nur bei 0,17-0,19 liegt. Dies kann als ein Hinweis auf eine mutmaßliche, horizontale Anordnung der Stabilisatormoleküle ausgefasst werden. Die beiden Rotationskorrelationszeiten  $\theta_1$  und  $\theta_2$  fallen etwas länger aus. Eine Ursache dafür ist die größere Kettenlänge des Stabilisatormoleküls. In der reinen Stabilisatorlösung wird eine Rotationszeit von ca. 200 ps bestimmt, welche somit um etwa 70 ps länger ist als die der 6-Aminohexansäure und gut zu den ermittelten 180 ps des Dodecylamins (Tab. 6.7) mit vergleichbarer Kettenlänge passt.

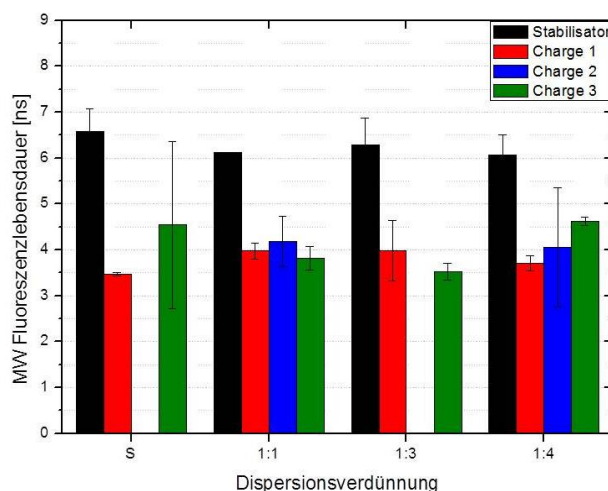
**Tab. 6.15** Fitergebnisse des Anisotropiezerfalls der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0, 2:1 stabilisierten Proben aus Charge 3

Probe	$g_1 \pm$ %	$\theta_1 \pm$ ns	$g_2 \pm$ %	$\theta_2 \pm$ ns	$g_\infty \pm$ %	$r_0 \pm$
S	49 16	0,50 0,07	28 8	6,53 2,66	41 16	0,192 0,077
1:1	28 2	0,59 0,03	25 1	4,91 0,54	46 2	0,294 0,007
1:3	33 4	0,46 0,09	26 2	3,91 0,63	41 5	0,286 0,026
1:4	27 6	0,53 0,11	27 1	4,03 0,73	46 6	0,26 0,027
1:5	25 1	0,65 0,09	25 2	6,03 1,82	50 2	0,267 0,054

Ein weiterer Grund wird aber vermutlich die größere Partikelgröße sein, die sich durch die größere Restanisotropie andeutet. Diese besitzt bei den mit 12-Aminododecansäure stabilisierten Partikeln einen relativen Anteil von 40-50 %, welcher über den gesamten Dispersionsverdünnungsbereich recht konstant ist. Zur Erinnerung, bei der Stabilisierung mit 6-Aminohexansäure weist die Restanisotropie einen relativen Anteil von nur 5-25 % auf und ändert sich mit der Dispersionsverdünnung hin zu niedrigeren Anteilen (siehe Abb. 6-31). Daraus kann man vermuten, dass die hier vorliegenden Partikeldispersionen in ihrer Größenverteilung inhomogen sind und deutlich über der Primärpartikelgröße liegen. Es ist schwer daraus eine allgemeingültige Aussage über die Güte der Stabilisierung mit kurz- oder langkettigen Aminocarbonsäuren zu treffen. Es wurden zwar mehrere Chargen vermessen, jedoch handelt es sich trotzdem nur um Stichproben und die statistische Sicherheit ist begrenzt. Es hat sich generell herausgestellt, dass es bereits innerhalb einer Charge, oder sogar einer Dispersionsverdünnung zu Varianzen kommen kann. Dies macht es schwierig einzelne Faktoren zu benennen, die diese Änderungen bedingen. Wiederholen sich diese Effekte jedoch im nachfolgenden Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,1:1 kann das Verhalten evtl. der Kettenlänge des Stabilisators zugeschrieben werden.

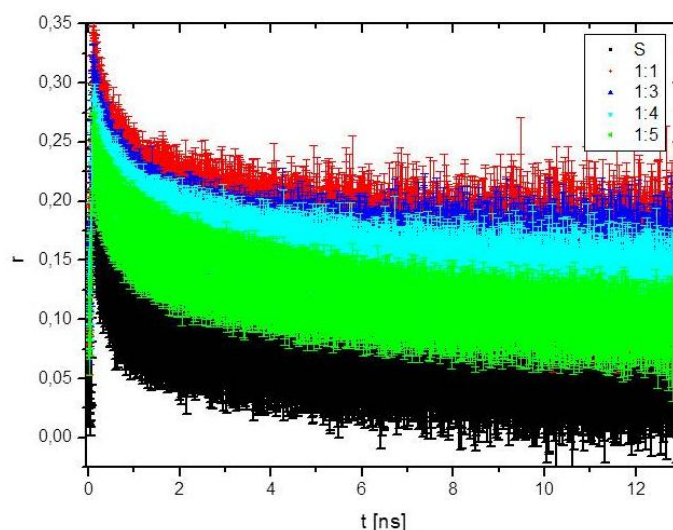
#### **Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,1:1:**

In Abbildung 6-40 ist abermals ein deutlicher Unterschied in der Fluoreszenzlebensdauer zwischen den reinen Stabilisatorlösungen und den Partikeldispersionen auszumachen. Auch hier scheint es in einzelnen Dispersionsverdünnungen einiger Chargen auch freie Stabilisatormoleküle zu geben, da dort die Lebensdauer eine große Abweichung vom Mittelwert hat und mit Ausreißern fast die Lebensdauer der reinen Stabilisatorlösungen erreicht.



**Abb. 6-40** Fluoreszenzlebensdauern Anisotropiezerfallskurven der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 1:1 stabilisierten Proben mehrerer Chargen

Dies ist zum Beispiel bei Dispersionsverdünnung S von Charge drei zu beobachten. Dazu passt der in Abbildung 6-41 dargestellte Anisotropiezerfall dieser Charge. Die schwarze Zerfallskurve, welche zur Dispersionsverdünnung S gehört, klingt am schnellsten ab. Dies kann als weiterer Hinweis angesehen werden, dass die Dispersion inhomogen ist und neben den stabilisierten Partikeln auch freien Stabilisator enthält. Das gleiche zeigt sich auch schon im vorherigen Abschnitt beim Stabilisator/Partikel-Verhältnis 0,2:1 in den Abbildungen 6-38 und 6-39. Auch dort zeigt die Lebensdauer für die Dispersionsverdünnung S eine breite Varianz und der Anisotropiezerfall verläuft zügiger als in den anderen Dispersionsverdünnungen.



**Abb. 6-41** Anisotropiezerfallskurven der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 1:1 stabilisierten Proben aus Charge 3

Die Abklingkurven der restlichen Dispersionen zeigen wieder das unter Abbildung 6-31 beschriebene Verhalten.

Es ist gut zu erkennen, dass das  $r_0$  mit Zunahme der Dispersionserdünnung der Partikellösungen leicht sinkt, die gelabelten Stabilisatormoleküle können mit Abnahme der Partikelkonzentration in der Lösung wieder leichter diffundieren und sind sterisch nicht mehr so stark gehemmt.

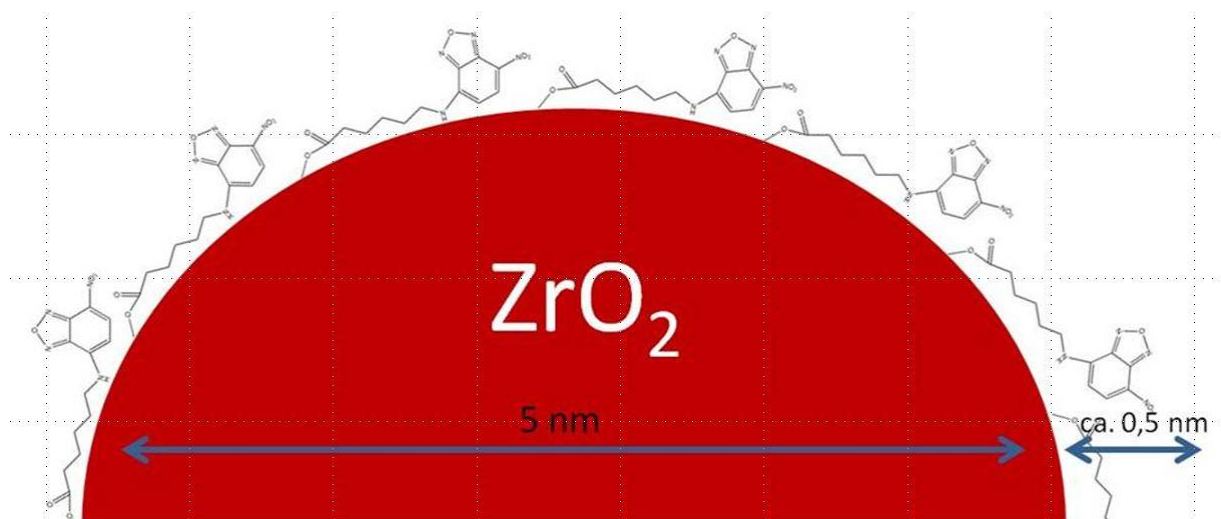
**Tab. 6.16** Fitergebnisse der mit 12-Aminododecansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 1:1 stabilisierten Proben aus Charge 3

Probe	$g_1$ ± %	$\theta_1$ ± ns	$g_2$ ± %	$\theta_2$ ± ns	$g_\infty$ ± %	$r_0$ ±
S	47 13	0,41 0,07	24 2	3,15 0,48	29 14	0,243 0,053
1:1	32 4	0,36 0,19	24 4	3,78 0,49	45 9	0,309 0,044
1:3	29 2	0,53 0,02	22 3	3,79 0,56	48 5	0,283 0,036
1:4	26 3	0,53 0,02	28 2	5,14 0,18	45 5	0,273 0,021
1:5	30 8	0,54 0,05	34 8	4,94 0,85	36 3	0,246 0,023

Zusätzlich ist bei dieser Charge wieder zu vermuten, dass die Partikel wieder deutlich über der Primärpartikelgröße liegen, da der Anteil der Restanisotropie mit etwa 30-50 % wieder einen großen Beitrag am Anisotropiezerfall besitzt (Tab. 6.16). Dieses Verhalten kann aber nicht dem Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses, oder der Kettenlänge des Stabilisators auf die Qualität der Stabilisierung angemessen werden, sondern scheint vielmehr ein Beleg dafür zu sein, dass die Partikelsynthese bzw. post-synthetische Stabilisierung der Probenansätze nicht immer die gleiche Qualität und Anzahl an stabilisierten Partikeln hervorbringt. Die hier durchgeführten Fluoreszenz mikroskopischen Untersuchungen sind sehr sensitiv und reagieren auf kleinste Änderungen in der Mikroumgebung, so dass die Varianzen, die aus der Synthese oder Stabilisierungsreaktion, wie auch aus dem Fluoreszenzlabeling und der Probenvorbereitung hervorgehen sichtbar werden. Neben diesen Effekten lässt sich durch die Untersuchungen in dieser Arbeit beim  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikelsystem, welches mit Aminocarbonsäuren als Stabilisatoren gegen die Agglomeration geschützt wird, kein Einfluss der Stabilisatorkettenlänge, oder des eingesetzten Verhältnisses zwischen Stabilisatormolekülen und Metalloxid auf die Stabilisierungsreaktion erkennen. Dieses Ergebnis unterstützt den bisherigen Wissensstand des Projektpartners (Institut für

Partikeltechnik). Wobei es mittels Fluoreszenzlebensdauerbestimmungen und Anisotropieuntersuchungen generell nicht möglich ist, Aussagen über die absolute Menge an stabilen Partikeln in einer Lösung zu machen, da die bestimmten Größen intensitätsunabhängig sind. Es können vielmehr qualitative Aussagen über die Wechselwirkungen zwischen Stabilisator und Partikeloberfläche und der Homogenität einer Partikelprobe getroffen werden. Durch die Höhe der Restanisotropie  $r_\infty$  kann abgeschätzt werden in welcher Größenordnung die stabilisierten Partikel vorliegen. Eine große Varianz dieser Größe deutet eine inhomogene Partikelgrößenverteilung an. Die bestimmten Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer und dem Anisotropiezerfall zwischen Partikellösung und Vergleichslösung zeigen an, wie stark die Wechselwirkungen zwischen diesen beiden Komponenten sind. Diese sind beim  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem sehr groß und unterstützen somit die Aussage von Grote et al. (2012), dass sich eine kovalente Bindung zwischen der Carboxylgruppe des Stabilisators und dem Zirkoniumzentrum an der Partikeloberfläche ausbildet.<sup>[GRO2012b]</sup>

Aufgrund der höheren initialen Anisotropie  $r_0$  bei den mit 12-Aminododekansäure stabilisierten Partikeln im Vergleich zur Stabilisierung mit 6-Aminohexansäure, kann gemutmaßt werden, dass die räumliche Anordnung der Stabilisatormoleküle auf der Partikeloberfläche eher als horizontal einzustufen ist. Abbildung 6-42 zeigt ein Modell dieser Überlegung.



**Abb. 6-42** Modell zur horizontalen Anlagerungshypothese am  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem

## **7 Zusammenfassung und Ausblick**

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Anwendung der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie in verschiedenen Bereichen der Materialwissenschaften zur Charakterisierung von porösen, funktionalisierten Oberflächen und der Wechselwirkung zwischen Stabilisatoren und Nanopartikeln. Die Zusammenfassung ist in diese beiden Anwendungsbereiche untergliedert. Zunächst werden die Ergebnisse der porösen, funktionalisierten Polymer- bzw. Keramikoberflächen, die Gegenstand von Kapitel 4 und 5 sind, zusammengefasst. Im Anschluss daran werden die Resultate der erstmaligen Anwendung einer zeitaufgelösten Anisotropiemessung zur Bestimmung der Wechselwirkungen zwischen dispergierten Nanopartikeln und ihren umgebenen Stabilisatormolekülen aus Kapitel 6 resümiert.

### **7.1 Poröse, funktionalisierte Oberflächen**

Die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie eignet sich durch die Möglichkeit Proben dreidimensional orts aufgelöst zu untersuchen hervorragend für Untersuchungen an porösen Oberflächenstrukturen, wo es um die Homogenität der Probenstruktur oder die Eindringtiefe bestimmter funktioneller Gruppen in die Porenstruktur der Probe geht. So konnte gezeigt werden, dass es nach Durchführung eines Markierungsverfahrens mit einem aminogruppenselektiven Fluoreszenzfarbstoff möglich ist, mit der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie, Aminogruppen orts aufgelöst mit einer Auflösung von wenigen hundert Nanometern zu detektieren. Die Pionierarbeit von Ehlers (2011), ebenfalls aus dieser Arbeitsgruppe, zu Anwendungen dieser Art in den Materialwissenschaften konnte in dieser Arbeit erfolgreich fortgeführt und erweitert werden.

Unter Zuhilfenahme der Technik der Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie wurde ein großer Probensatz mit plasmaminierten Hohlfasermembranen, hergestellt von der Gambro GmbH aus Hechingen, zum Einsatz als Plasmafilter in der Medizintechnik, auf eine homogene Oberflächenstruktur und homogene Aminogruppendichte hin untersucht. Ziel war es, mit den Untersuchungen den Prozess der Plasmaminierung zu optimieren. Für die Anwendung der Membrane als Plasmafilter ist es wichtig, dass eine möglichst hohe Aminogruppendichte im porösen Substrat, bestehend aus einem Copolymer aus PVP und P(A)ES erzielt wird und diese homogen über den funktionalisierten Bereich verteilt ist. Nur

so entstehen in der gesamten Membran gleichmäßige Absorptionseffekte, die es ermöglichen Blutplasma und Blutzellen voneinander zu trennen. Die Menge an Aminogruppen, die durch den Plasmaprozess auf die Membrane aufgebracht werden, wie auch deren Verteilung innerhalb der Membrane hängt maßgeblich von den Prozessparametern während der Plasmabehandlung, wie auch von der Porenstruktur des Substrats ab. Es wurden 10 Proben untersucht, die eine einheitliche Porengröße von durchschnittlich  $0,3\ \mu\text{m}$  aufwiesen, aber in den Prozessparametern der Plasmaaminierung zum Teil deutlich voneinander abwichen. Nach Fluoreszenzmarkierung der Aminogruppen mittels NBD-F wurden pro Probe mindestens 10 Einzelmessungen durchgeführt. Dazu wurden Aufnahmen der Fluoreszenzintensität aus dem Querschnitt der Hohlfasermembrane erstellt. In den aufgenommenen Fluoreszenzintensitätsbildern ist der äußere Faserrand immer gut zu erkennen. In manchen Aufnahmen, wie zum Beispiel in Abbildung 4-6, ist sogar der innere Faserrand zu erkennen. Die Fluoreszenzintensität steigt auf den ersten  $\mu\text{m}$  der Membranen sehr stark an und fällt dann exponentiell mit der Tiefe ab. Aufgrund einer etwas größeren Porenstruktur im oberflächennahen Raum, befindet sich das Maximum der Fluoreszenz etwas weiter in das Innere der Membran versetzt. Ursache ist ein mit den größeren Hohlräumen verbundenes kleineres Messvolumen im Fokalkpunkt der Anregung. In größerer Tiefe der Membran befinden sich bei kleinerer Porenstruktur mehr Aminogruppen im Messvolumen, wodurch die Fluoreszenzintensität steigt.

Anschließend wurde die gesammelte Fluoreszenzintensität, die proportional zur Aminogruppendichte auf den Membranen ist, über die gesamte Scanfläche integriert. Diese Daten wurden tabelliert und statistische Mittelwerte gebildet. Je höher die aufsummierte Fluoreszenzintensität, desto besser eignen sich die Prozessparameter für eine erfolgreiche Plasmaaminierung mit hoher Aminogruppendichte, da die Aminogruppendichte am höchsten ist. Eine niedrige Standardabweichung spiegelt hingegen eine homogene Aminogruppendichte innerhalb der 10 Stichproben wider und kann somit als Maß für die Homogenität der Aminogruppendichte angesehen werden. Durch Anwendung des Stichproben-*t*-Tests auf diese Intensitätswerte konnte festgestellt werden, welche Proben sich mit hoher Wahrscheinlichkeit unterscheiden lassen, so dass die Einflussgröße ausgewählter Prozessparameter auf das Ergebnis der Aminierung sichtbar gemacht werden konnte. Wie zu erwarten war, zeigen sich Differenzen in der Intensität und dem Tiefenprofil zwischen den einzelnen Proben, aber auch die Ergebnisse innerhalb einer Probe weisen eine zum Teil starke Schwankungsbreite auf.

Nach den tabellierten Flächeninhalten, liefern die Proben 6 und 8 die größte Aminogruppendichte auf den Hohlfasermembranen. Für die Optimierung des

Plasmaprozesses bedeutet dies, dass die für diese Proben gewählten Prozessparameter von den hier untersuchten am geeignetsten sind, um hohe Aminogruppen zu erzielen. Daher sollte die Prozessentwicklung in Richtung dieser Parameter weiter verfolgt werden.

An Hand dieses Beispiels konnte gezeigt werden, dass die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie in den Materialwissenschaften gut angewendet werden kann, um Aminogruppen auf Oberflächen orts aufgelöst zu visualisieren und die Methode eine gute Wahl ist, um die Qualität der Plasmafunktionalisierung zu prüfen und Einflussgrößen verschiedener Prozessparameter auf die Funktionalisierung sichtbar zu machen und zu überwachen. Somit kann die vorgestellte Methode als adäquates Hilfsmittel in der Prozessoptimierung eingesetzt werden.

An einem weiteren Beispiel konnte gezeigt werden, dass diese Mikroskopieart nicht nur auf die Untersuchung von Polymeroberflächen beschränkt ist, sondern auch für funktionalisierte keramische Materialien anwendbar ist. In der Arbeitsgruppe Advanced Ceramics der Universität Bremen werden aus Zirkondioxid poröse Mikromembranröhrchen gesintert und in einem chemischen Verfahren zunächst aktiviert und dann mit den aminogruppenhaltigen Substanzen APTES und AE-APTES aktiviert. Ziel ist es, mit Hilfe dieser Membranröhrchen von Viren kontaminiertes Trinkwasser in Entwicklungsländern zu reinigen. Dazu muss eine homogene Porenstruktur vorliegen, um die Viren durch Größenausschluss aus dem Wasser zu entfernen. Durch die Funktionalisierung der Membran mit APTES bzw. AE-APTES sollen die Viren ebenfalls durch einen Adsorptionseffekt zurück gehalten werden, indem die Membran bei neutralen pH Werten positiv geladen ist und die Viren durch Ladung absorbiert. Mit Hilfe der Zweiphotonen-Mikroskopie ist es auch hier möglich, wichtige Informationen über die Homogenität der Porenstruktur, der Homogenität der Aminierung und deren Behandlungstiefe zu visualisieren. Deshalb kann die Methode auch in diesem Anwendungsgebiet dazu dienen, den Entwicklungsprozess der Mikromembranen aufzuzeigen und somit weiter voranschreiten zu lassen. Für einen sicheren Einsatz in den Entwicklungsländern ist es wichtig, dass die Aminierung homogen ist und tief in die Membran hinein reicht, um die Funktionalität als Virenfilter zu gewährleisten.

Für die Visualisierung der Aminogruppen wurden nach der Fluoreszenzmarkierung mit den Farbstoffen NBD-F und Fluram Tiefenscans durchgeführt, in dem die Probe dreidimensional abgerastert wurde. Dazu wurden zweidimensionale Fluoreszenzintensitätsbilder in mehreren Tiefen der Probe aufgenommen (z-Scan) und anschließend zu einem 3D Bild zusammengesetzt. In diesen Aufnahmen ist die Oberflächentopographie sehr gut zu erkennen. Die Oberflächenstruktur ist sehr rau, da sie viele Unebenheiten mit zum Teil großen



Höhenunterschieden aufzeigt. Im Vergleich zu den Untersuchungen an den Hohlfasermembranen der Gambro GmbH ist hier die Oberfläche deutlich rauer (vgl. dazu Abbildung 4-3 und Abbildung 5-4). Grund dafür dürfte die unterschiedliche Porösität der beiden Substrate sein, denn die Keramikmembran in Abbildung 5-4 hat eine durchschnittliche Porengröße von nur 30 nm.

Die 3D Bilder der mit NBD-F markierten Keramikröhrchen zeigen eine gleichmäßige Durchdringung des Farbstoffs, bzw. der aminogruppenhaltigen Substanzen APTES und AE-APTES an, da die Oberflächenstruktur betrachtet von der Oberseite des Tiefenscans nicht von der Betrachtung von der Unterseite der Funktionalisierung zu unterscheiden ist. Beide Ansichten zeigen eine vergleichbare Topographie, so dass auch auf eine homogene Porenstruktur in diesem Tiefenbereich geschlossen werden kann. Generell zeigen die Aufnahmen auch hier wieder, dass die maximale Fluoreszenzintensität nicht direkt an der äußeren Oberfläche der Röhrchen liegt, sondern wieder etwas weiter im Inneren, welches wieder mit der verminderten Probendichte im Anregungsvolumen korreliert werden kann. Zum Teil sind in den Aufnahmen kleine Breiche in den Röhrchen zu sehen, in denen keine Fluoreszenzintensität gemessen wurde. Folglich sind in diese Bereiche bei der Funktionalisierung mit APTES oder AE-APTES keine Aminogruppen gelangt, oder beim Farbstofflabeling kein aminogruppensensitiver Farbstoff. Beides scheint gleich möglich, da beide Stoffe nur durch Diffusionsprozesse in die Mikromembranen eindringen können und beide sich in ihrer Größe nicht stark voneinander unterscheiden. Des Weiteren können als Ursache auch kleine Unterbrechungen in der ansonsten homogenen Porenstruktur angenommen werden, die zu größeren Hohlräumen führen. Solche Unterbrechungen in der Porenstruktur sind bereits in einer REM-Aufnahme angedeutet (Abbildung 5-1).

Um eine Aussage über die tatsächliche Eindringtiefe der Aminogruppen in die Membran treffen zu können, wurden die Intensitäten über die gesamte Fläche eines Einzelbildes aus der x-y Ebene integriert und die so erhaltenen Werte der Einzelbilder gegen die Tiefe (z) aufgetragen. An das daraus resultierende Intensitätstiefenprofil konnte ein Lorentz Fit angepasst werden, dessen Halbwertsbreite als Maß für die Schichtdicke der Aminofunktionalisierung angenommen werden kann. Aus den daraus gewonnenen Ergebnissen ist es möglich, die Fragestellungen des Projektpartners zu beantworten. So konnte gezeigt werden, dass sich die Schichtdicken für die beiden zur Aminogruppenfunktionalisierung verwendeten Substanzen (APTES und AE-APTES) nicht signifikant unterscheiden. Die mittleren Schichtdicken liegen zwischen 25 und 35  $\mu\text{m}$  und liegen damit weit oberhalb der Auflösung des Messsystems mit einigen Hundert Nanometern.

Die statistischen Abweichungen sind zum Teil recht groß. Die Ursache ist zum einen in der Rauigkeit der Oberfläche, welche Höhen und Tiefen aufweist, aber auch in einer zu erwartenden Varianz in der Eindringtiefe des APTES bzw. AE-APTES zu suchen.

Da bei der Mittelung der Intensitätswerte über die gesamte Scanfläche, bedingt durch die Rauigkeit der Proben, möglicherweise auch Nebenmaxima mit in die Integration einbezogen werden und so das Intensitätsprofil verbreitern, sind die oben angegebenen Schichtdicken als Obergrenzen zu betrachten. Bei Mittelung der Intensitäten über kleine Bereiche der Probe ( $2 \times 2 \mu\text{m}^2$ ) werden solche Nebenmaxima aufgelöst (Abbildung 5-10) und können in der Berechnung der Schichtdicke mit berücksichtigt werden. Als Resultat werden dünnere Schichtdicken im Bereich von 20 bis 25  $\mu\text{m}$  erhalten. So konnte gezeigt werden, dass es für Schichtdickemessungen an rauen und porösen Strukturen vorteilhaft ist die mittleren Fluoreszenzintensitäten für das Intensitätsprofil und die anschließende Funktionsanpassung aus einem möglichst kleinen Bereich der Probe heran zu ziehen. Die Schichtdicken zwischen APTES und AE-APTES bleiben trotz der Mittelung des Signals über kleinere Flächen nicht unterscheidbar.

Ein möglicher Verdacht, dass die Funktionalisierung von der inneren Oberfläche her schlechter ist als von der Äußeren, da dort das APTES bzw. AE-APTES möglicherweise während der Funktionalisierung nicht so tief eindringen kann, da es erst in den Hohlraum des Membranröhrchens hinein diffundieren muss, konnte sich bei den mit NBD-F markierten Proben nicht erhärten.

Eine Art Sonderstellung nehmen die mit Fluram gelabelten Proben ein. Dort wurde bei Mittelung über die gesamte Scanfläche ein deutlicher Unterschied in der Behandlungstiefe zwischen äußerer und innerer Oberfläche bestimmt (26  $\mu\text{m}$  zu 18  $\mu\text{m}$ ). Während der Wert für die äußere Oberfläche gut zu den Ergebnissen der mit NBD-F markierten Proben passt, fällt die Schichtdicke der inneren Oberfläche deutlich kleiner aus. In den z-Scans von der Außenseite ist bereits gut zu erkennen, dass die Oberflächenstruktur an der oberen Oberfläche deutlich von der unteren Seite des z-Scans abweicht. Von der Unterseite her ist das Profil viel rauer. Dies ist besonders gut in der Seitenansicht in Abbildung 5-8 festzustellen. Möglicherweise kann das Fluram aufgrund seiner etwas größeren Größe im Vergleich zum NBD-F nicht so gleichmäßig in die Substratstruktur ein diffundieren. Dieser Effekt führt dann zu einer größeren Varianz in der Schichtdickebestimmung. Durch die Auswertung der Schichtdicke über  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  können Nebenmaxima wieder mit berücksichtigt werden und so sinkt die Schichtdicke für die äußere Oberfläche auf 10  $\mu\text{m}$  und ist wieder mit der Schichtdicke die für die innere Oberfläche ermittelt wurde (ebenfalls ca. 10  $\mu\text{m}$ )

vergleichbar. Die Markierung mit Fluram liefert demnach deutlich geringere Behandlungstiefen als die Markierung mit NBD-F. Um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erzielen, sollten die Farbstoffe, die für die Markierung verwendet werden, in der gleichen Größenordnung liegen, wie die damit zu markierenden Substanzen, um sicher zu stellen, dass der Fluoreszenzfarbstoff genauso tief in die Porenstruktur des Substrats eindringen kann. Deshalb sollte in diesem Fall die Markierung eher mit NBD-F erfolgen.

Bei Messungen an Proben mit einer mittleren Porengröße von 90 nm werden in Fluoreszenzbildern von der Oberfläche der Röhrchen im Vergleich zu den Fluoreszenzbildern von Proben mit einer durchschnittlichen Porengröße von 30 nm größere, nicht funktionalisierte Bereiche sichtbar. Generell ist dort die Oberflächenstruktur gröber. Erste Messungen zur Behandlungstiefe ergaben, dass sich diese nicht signifikant von den Proben mit kleinerer Porengröße unterscheidet. Allerdings wurden hier nur wenige Messungen durchgeführt. Für eine statistisch abgesicherte Aussage sollten hier weitere Messungen erfolgen.

Auch diese Anwendung zeigt, dass die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie in den Materialwissenschaften gut zur Charakterisierung von porösen Oberflächen eingesetzt werden kann. Unter Verwendung weiterer Fluoreszenzfarbstoffe, die nach Reaktion mit anderen funktionellen Gruppen Fluoreszenz zeigen, eröffnet sich ein noch weiteres Anwendungsspektrum dieser Methode, jenseits der Visualisierung von Aminogruppen. Der große Vorteil dieser Mikroskopieart ist, dass die Fluoreszenz wirklich nur im Fokuspunkt der Anregung erzeugt wird und neben Informationen über die Oberflächenbeschaffenheit, die auch durch gängige Mikroskopiearten gewonnen werden können, zusätzlich spezifische, chemische Informationen erhalten werden.

## **7.2 Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und Stabilisatormolekülen**

In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal versucht mittels Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie Wechselwirkungen zwischen dispergierten Metalloxid-Nanopartikeln und ihren stabilisierenden Liganden (sogenannten Stabilisatormolekülen) zu untersuchen und zu charakterisieren. Nach bestem Wissen des Autors ist dies vorher noch nie versucht worden.

Mit einer Kombination aus Fluoreszenzlebensdauerbestimmung und Analyse von Anisotropiezerfallskurven aus zeitaufgelösten Anisotropiemessungen werden zunächst

Lösungen des reinen Stabilisatormoleküls untersucht. Anschließend erfolgen die gleichen Messungen an stabilisierten Partikeldispersionen. Unterschiede zwischen beiden Messreihen werden dann der Wechselwirkung zwischen Partikeloberfläche und Stabilisatormolekül zugeschrieben. Je größer die Unterschiede, desto stärker die Wechselwirkung, die von einfacher statischer Wechselwirkung bis hin zu kovalent ausgebildeten Bindungen reichen kann.

Die vermessenen Nanopartikel wurden am Institut für Partikeltechnik der Technischen Universität Braunschweig hergestellt. Um Effekte wie Fluoreszenzquenching aufgrund zu hoher Partikel- oder Stabilisatorkonzentrationen aufzudecken, wurden die vom Projektpartner erhaltenen Proben vor der Farbstoffmarkierung mit NBD-F in mehreren Abstufungen verdünnt.

Untersucht wurden zwei unterschiedliche Metalloxid-Nanopartikelsysteme. Die ITO-Partikel lassen sich mit *n*-Alkylaminen oder Diaminen stabilisieren, während die  $\text{ZrO}_2$ -Partikel mit Carbonsäuren bzw. Aminocarbonsäuren stabilisiert werden. Nach bisherigen Untersuchungen des Projektpartners unterscheiden sich beide System in ihren Wechselwirkungen. Beim ITO-System liegen nur schwache Wechselwirkungen vor, vermutlich auf Basis von Van-der-Waals Kräften. Beim  $\text{ZrO}_2$ -System bilden sich nach NMR Messungen des Projektpartners kovalente Bindungen der Carbonylgruppe zum Zirkoniumatom aus.<sup>[GRO2012a], [GRO2012b]</sup>

Diese Unterschiede werden auch in den Fluoreszenzuntersuchungen deutlich.

Beim ITO-Partikelsystem, das mit *n*-Alkylaminen stabilisiert wurde, unterscheiden sich die Fluoreszenzlebensdauern von Vergleichslösung und Partikeldispersion nur geringfügig, aber dennoch signifikant. Je nach Kettenlänge des Stabilisators und Dispersionsverdünnung unterscheiden sich die Lebensdauern um bis zu 1,2 ns. Da die Lebensdauer in den Partikellösungen höher ist, kann davon ausgegangen werden, dass die Wechselwirkung den angeregten Zustand der NBD-Gruppe leicht stabilisiert. Die Differenz in der Lebensdauer steigt mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators von Amylamin bis Dodecylamin leicht an. Zusätzlich scheinen die Dispersionen, die mit den langkettigen Stabilisatormolekülen stabilisiert werden, in einem größeren Konzentrationsbereich stabil zu sein, da die Differenzen in der Lebensdauer auch bei hohen Verdünnungen noch bestehen bleiben, während sich im Falle des Amylamins die Fluoreszenzlebensdauern mit der Verdünnung rasch angleichen. Die Messungen an Proben mit unterschiedlichem Stabilisator/Partikel-Verhältnis (1:1 und 0,5:1) erzeugen keine signifikanten Unterschiede in der Fluoreszenzlebensdauer, so dass kein Einfluss des Stabilisator/Partikel-Verhältnisses auf die Stabilisierung erkannt werden kann. Sollte sich dieser nur auf die Anzahl der stabilisierten

Partikel auswirken, so wäre er durch Lebensdauermessungen auch nicht feststellbar, da diese intensitätsunabhängig sind. Um eine Wirkung auf die Lebensdauer zu erzeugen, müsste sich die Art der Wechselwirkung ändern. Dies ist allerdings nur auf Grund einer höheren Stabilisatormenge pro Partikel nicht zu erwarten. Die Analyse des Anisotropiezerfalls deckt keine Unterschiede zwischen Partikel- und Vergleichslösungen auf. Alleinig mit der Kettenlänge des Stabilisators nehmen die Rotationskorrelationszeiten leicht zu. Sie steigen von 120 ps bei Amylamin bis zu 180 ps im Fall des Dodecylamins. So kann aus diesen Messungen geschlossen werden, dass es vermutlich schwache Wechselwirkungen zwischen den Stabilisatormolekülen und der Partikeloberfläche gibt, die durch die Fluoreszenzlebensdauermessungen erkannt werden können und die sich mit Zunahme der Kettenlänge des Stabilisators leicht verstärken. Dies führt zu der Vermutung, dass die Stabilisatormoleküle horizontal auf der Partikeloberfläche angeordnet sind, denn sonst würde sich der Einfluss der Kettenlänge nicht erklären lassen. Auch der Projektpartner hat festgestellt, dass mit Zunahme der Kettenlänge weniger Stabilisatormoleküle notwendig sind, um die gleiche Partikelmenge zu stabilisieren. Die Wechselwirkung scheint jedoch so schwach zu sein, dass die mit NBD-F fluoreszenzmarkierten Stabilisatormoleküle in ihrer freien Bewegung nicht eingeschränkt werden, da es zu keinen Unterschieden in den Anisotropiezerfallskurven kommt. So kann die Vermutung aus den Lebensdauermessungen, dass die Stabilisatormoleküle horizontal angeordnet sind, weder eindeutig belegt noch widerlegt werden. Die Vermutung der Projektpartner, dass die Wechselwirkung über schwache van der Waals Kräfte abläuft, scheint hingegen wahrscheinlich, zumal diese Schlussfolgerung mit den Ergebnissen von Greenough und Blanchard (2006) übereinstimmt, die die Rotationskinetik eines NBD-Chromophors in Vesikellösungen untersucht haben und ebenfalls keinen Unterschied in der Rotationskorrelationszeit zwischen Vesikel- und Vergleichslösung aufdecken konnten und daraus folgend auf ionische Wechselwirkungen mit einer Stärke von nur wenigen kcal/mol angenommen haben.<sup>[GRE2006]</sup>

Um ein klareres Bild zu erhalten, wurden auch Messungen an mit Diaminen stabilisierten ITO Partikeln durchgeführt. Da diese im Vergleich zu den im Vorangegangenen beschriebenen Partikeln nicht in Chloroform, sondern in Alkoholen unterschiedlicher Kettenlänge stabil sind, konnte hier zusätzlich der Einfluss der Polarität und der Viskosität des Lösungsmittels untersucht werden. Dabei wird bei der Stabilisierung mit Ethylendiamin in den Vergleichs- und Partikelpuben ein biexponentielles Fluoreszenzverhalten gefunden. Eine Kontrollmessung mit Heptylendimain ergibt hingegen nur eine Lebensdauer, so dass vermutet wird, dass das biexponentielle Verhalten der Struktur des Ethylendiamins zuzuschreiben ist.

Möglicherweise können beide Aminogruppen mit der NBD-Gruppe des Farbstoffs wechselwirken, da sie nur um eine Ethylgruppeneinheit voneinander entfernt sind und generieren somit zwei Lebensdauern. Um dies detailliert aufzuklären, sollten allerdings weitere Messungen und vor allem auch quantenmechanische Rechnungen angestellt werden.

Die kurze Lebensdauer liegt je nach verwendetem Lösungsmittel zwischen 0,5 und 2 ns und ist in Vergleichs- und Partikellösung nicht signifikant voneinander unterscheidbar. Daher kann geschlossen werden, dass die Partikelwechselwirkung keinen Einfluss auf den Zustand hat, der diese Lebensdauer erzeugt. Anders sieht es bei der langen Lebensdauer aus, diese ist außer bei der Stabilisierung in Ethanol, wo sie in der Partikelprobe länger ist, in allen anderen Lösungsmitteln in den Partikeldispersionen signifikant kürzer als in den Vergleichslösungen, so dass der angeregte Zustand, der diese lange Lebensdauer aufweist, durch die Wechselwirkung mit der Partikeloberfläche destabilisiert wird und der strahlungslose Zerfall zunimmt. So kann an Hand der langen Lebensdauer, die in den Partikellösungen zwischen 8 und 11 ns liegt, ein Einfluss der Partikelwechselwirkung erkannt werden, denn diese unterscheidet sich je nach Lösungsmittel zwischen 1 ns in Ethanol und Butanol bis hin zu 4 ns in Decanol von der reinen Stabilisatorlösung. So dass gleichzeitig vermutet werden kann, dass auch das Lösungsmittel Einfluss auf die Stabilisierung hat. Demnach müsste die größte Wechselwirkung zwischen Partikel und Stabilisatormolekül im Zusammenhang mit der Stabilisierung in Decanol auftreten. Dazu gibt es allerdings zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Vergleichsmessungen mit den bewährten Methoden der Projektpartner, die dies belegen.

Allgemein zeigen die gemessenen Fluoreszenzlebensdauern eine Abhängigkeit von der Viskosität und Polarität des verwendeten Lösungsmittels, unabhängig von der Partikelwechselwirkung. Mit Zunahme der Viskosität nimmt die Lebensdauer zu. Mit Zunahme der Polarität des Lösungsmittels sinkt sie hingegen. Da beide Einflussgrößen hier nicht vollkommen unabhängig voneinander untersucht werden konnten, ist es schwierig beide eindeutig voneinander zu trennen. In der Literatur ist bereits bekannt, dass der Farbstoff (NBD-F) sehr sensitiv gegenüber Änderungen in seiner Mikroumgebung reagiert. Das in dieser Arbeit aufgezeigte Verhalten ist gut mit den Untersuchungen von Fery-Forgues et al. (1993) und Greenough und Blanchard (2007) in Einklang zu bringen, die ebenfalls starke Abhängigkeiten der Fluoreszenzlebensdauer der NBD-Gruppe von den physikalischen Eigenschaften des Lösungsmittels aufgedeckt haben (Kapitel 3.4.2).

Die Analyse des Anisotropiezerfalls ergibt keine neuen Hinweise im Vergleich zu der Analyse des Anisotropiezerfalls der mit *n*-Alkylaminen stabilisierten ITO Partikel. Da die Wechselwirkung mit den Diaminen gleicher Art sein sollen, wie die mit den *n*-Alkylaminen,

war dies so zu erwarten. Es sind keine signifikanten Unterschiede in den Rotationskorrelationszeiten zwischen Vergleichs- und Partikellösung zu erkennen. Da die Viskosität bei den Alkoholen höher ist als beim Chloroform sind die Korrelationszeiten, wie nach dem Debeye-Stokes Einsteinmodell postuliert, länger als bei den *n*-Alkylamine und nehmen mit der Viskosität von Ethanol mit etwa 190 ps bis zum Decanol auf ca. 800 ps zu.

Die Messungen der mit Diaminen stabilisierten ITO Partikel und die Messungen der mit *n*-Alkylaminen stabilisierten Partikel zeigen demnach ein ähnliches Bild und bekräftigen sich somit gegenseitig.

Um wirklich zu zeigen, dass diese Methode dazu geeignet ist, Wechselwirkungen zwischen den Stabilisatormolekülen und der Partikeloberfläche anzuzeigen und zu charakterisieren, wurden weitere Messungen am  $\text{ZrO}_2$ -Partikelsystem vorgenommen, in der Zuversicht, dass dort aufgrund der, nach bisherigen Wissenstand, stärkeren Wechselwirkung größere Unterschiede zwischen Vergleichslösungen und Partikeldispersionen auftreten. Diese Erwartung wurde erfüllt.

In der Fluoreszenzlebensdauer sind große Unterschiede zu erkennen. Sie liegt in den reinen Stabilisatorlösungen im Bereich von 8 bis 9 ns und sinkt in den Partikeldispersionen im Mittel auf 4 ns ab und zeigt somit einen starken Einfluss der Stabilisator-Partikel-Wechselwirkung auf die Fluoreszenzlebensdauer an.

Dieser Eindruck wird durch die Anisotropiezerfallsanalyse bestätigt. Der Anisotropiezerfall der Partikelproben ist deutlich gehemmt gegenüber dem in den Vergleichslösungen.

In den Partikellösungen ist der Anisotropiezerfall biexponentiell. Es lässt sich eine kurze und eine lange Rotationskorrelationszeit bestimmen. Die kurze liegt im Bereich von 400 bis 800 ps, während die lange zwischen 2,5 und 9 ns schwankt, je nach Dispersionsverdünnung und vermessener Charge.

Der Anisotropiezerfall lässt sich nach dem Modell des nicht-assoziierten Anisotropiezerfalls interpretieren. Dabei zeigt die kurze Rotationskorrelationszeit die Rotation der NBD-Gruppe an, die am Ende des Stabilisatormoleküls sitzt, während die längere die Bewegung des gesamten Stabilisatormoleküls beschreibt. Da nach Ablauf des Laserpulses eine Restanisotropie bestehen bleibt, wird zusätzlich angezeigt, dass dieses Stabilisatormolekül an etwas großem angebunden sein muss, welches der Nanopartikel ist und somit sehr langsam rotiert und den Stabilisator in seiner Bewegung zusätzlich behindert. So das davon ausgegangen wird, dass die beiden Rotationskorrelationszeiten zwei lokalen Bewegungen zugeschrieben werden können, die schnell ablaufen, während es eine globale, sehr langsame Bewegung (die des gesamten Partikels) gibt, die sich in der Restanisotropie erkennen lässt.

Diese Interpretation passt sehr gut zu den Untersuchungen, die Loura und Ramalho (2007) zur Moleküldynamik von Lipidanaloga gemacht haben, die in Doppelmembranen eingebettet wurden.<sup>[LOU2007]</sup>

Es kann gezeigt werden, dass es mit der zeitaufgelösten Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie möglich ist, die Wechselwirkung zwischen Nanopartikeln und ihren Stabilisatoren zu charakterisieren. Ist die Wechselwirkung stark genug, um sich auf die Anisotropiezerfallskurven auszuwirken, so ist es sogar möglich qualitative Aussagen über die Partikelgröße zu machen und zu erkennen, ob große Schwankungen in der Partikelgrößenverteilung in einer Charge auftreten.

Die Methode kann auf alle Partikelsysteme mit aminogruppenhaltigen Stabilisatormolekülen angewendet werden. Unter Verwendung weiterer Fluoreszenzfarbstoffe, die nicht mit Aminogruppen, sondern spezifisch mit anderen funktionellen Gruppen Fluoreszenz zeigen, ist das Anwendungsspektrum sogar noch erweiterbar.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Zweiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie erfolgreich angewendet werden kann um poröse Substrate auf ihre Oberflächenstruktur und dreidimensionale Aminogruppendichte hin zu untersuchen. Desweiteren konnte eine neue Methode vorgestellt werden, die es ermöglicht, die Wechselwirkungen zwischen Nanopartikeln und ihren Stabilisatormolekülen zu charakterisieren und dabei einen höheren Informationsgehalt liefert als alleinig durch DLS und NMR Messungen zugänglich.



## 8 Literaturverzeichnis

- [ARN2007] Arnone RD., Walling JP. (2007). *Waterborne pathogens in urban watersheds*, Journal of Water and Health, 5, 1, 149-162
- [ATK1996] Atkins PW. (1996) *Physikalische Chemie*, VCH Verlagsgesellschaft mbH, 2. Auflage, Weinheim
- [BA2006] Ba J., Rohlfing DF., Feldhoff A., Brezesinski T., Djerdj I., Wark M., Niederberger M. (2006). *Nonaqueous Synthesis of Uniform Indium Tin Oxide Nanocrystals and Their Electrical Conductivity in Dependence of the Tin Oxide Concentration*, Chemistry of Materials, 18, 2848-2845
- [BAR1981] Barkley MD., Kowalczyk AA., Brand L. (1981). *Fluorescence decay studies of anisotropic rotations of small molecules*, Journal of Chemical Physics, 75, 3581-3593
- [BEC2004] Becker W., Bergmann A., Biscotti G., Rück A. (2004). *Advanced time-correlated single photon counting technique for spectroscopy and imaging in biomedical systems*, Proceedings of SPIE, 5340
- [BEC2005] Beck C., Dannemaier J., Göhl H., Krause B., Kurz E., Malthaner H., Müller M., Oehr C., Storr M. (Gambro Lundia AB, Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der Angewandten Forschung) (2005). *A Continious Method for Production of a Regioselective Porous Hollow Fibre Membrane*, WO2006006918 (A1)
- [BEL1972] Belford GG., Belford RL., Weber G. (1972). *Dynamics of fluorescence polarization in macromolecules*, Proceedings of the National Academy of Science USA, 69, 1392-1393
- [BEL1989] Belletête M., Lessar G., Durocher G. (1989). *Electronic spectroscopy of aromatic Schiff bases. X Specific interactions between 2-(ppdimethylaminophenyl)-3,3-dimethyl-3H-indole and water in p-dioxane-water mixtures. Polarity surrounding the fluorescence probe*, Journal of Luminescence, 42, 6 ,337-347
- [BEN2005] Benninger R., Hofmann O., Mc Ginty J., Requejo-Isidro J., Munro I., Neil M., Demello A., French P. (2005). *Time-resolved fluorescence imaging of solvent interactions in microfluidix decices*, Optics Express, 13 (16), 6275-85
- [BER1974] De Bernado S., Weigele M., Toome V., Manhart K., Leimgruber W. (1974). *Studies on the Reaction of Fluorescamine with Primary Amines*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 163, 390-399
- [BOA2002] Boal AK., Das K., Gray M., Rotello VM. (2002). *Monolayer exchange chemistry of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles*, Chemistry of Materials, 14, 2628-2636
- [BOL1961] Bollinger LM., Thomas GE. (1961). *Measurement of the Time Dependence of Scintillation Intensity by a Delayed Coincedence Method*, Review of Scientific Instruments, 32, 1044-1050
- [BOR1980] Born M., Wolf E. (1980). *Principles of Optics: Electromagnetic Theory of Propagation, Interference and Diffraction of Light*, 6<sup>th</sup> Edition, Pergamon, Oxford

- [BOR2005] Borst JW., Hink MA., van Hoek A., Visser AJ. (2005). *Effects of refractive index and viscosity on fluorescence and anisotropy decays of enhanced cyan and yellow fluorescent proteins*, Journal of Fluorescence, 15 (2), 153-160
- [CHA1987] Chattopadhyay A., London E. (1987). *Parallax Method for Direct Measurement of Membrane Penetration Depth Utilizing Fluorescence Quenching by Spin-Labeled Phospholipids*, Biochemistry, 26, 39-45
- [CHA1988] Chattopadhyay A., London E. (1988). *Spectroscopic and ionization properties of N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-labeled lipids in model membranes*, Biochimica et Biophysica Acta, 938, 24-34
- [CHA1998] Chambers A., Fitch RF., Halliday BS. (1998). *Basic Vacuum Technology*, IOP Publishing Ltd. 1998, 2<sup>nd</sup> Edition, Bristol
- [CHU1972] Chuang TJ., Eisinger KB. (1972). *Theory of Fluorescence Depolarisation by Anisotropic Rotational Diffusion*, Journal of Chemical Physics, 57, 5094-5097
- [CRE2011] Cremer C. (2011). *Lokalisationsmikroskopie – Lichtmikroskopie unterhalb des Abbe-Limits*, Physik in unserer Zeit, 1, 21-29
- [DEN1990] Denk W., Strickler JH., Webb WWW. (1990). *Two-photon laser scanning fluorescence microscopy*, Science, 248, 73-76
- [DIA2006] Diaspro A., Bianchini P., Vicidomini G., Faretta M., Ramoino P., Usai C. (2006). *Multi-Photon excitation microscopy*, BioMedical Engineering Online, 5,36
- [DIR1927] Dirac P.A.M. (1931). *The Quantum Theory of the Emission and Absorption of Radiation*, Proceedings of the Royal Society, A114, 243-267
- [EHL2011] Ehlers J.E. (2011). *Multiphotonen-Fluoreszenzmikroskopie an polymeren Systemen*, Dissertation, TU Braunschweig
- [FAL2014] Falk M., Hain J., Marohn F., Fischer H., Michel R. (2014). *Statistik in Theorie und Praxis*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- [FEL1975] Felix AM., Toome V., De Bernardo S., Weigle M. (1975). *Colorimetric Amino Acid Analysis Using Fluorescamine*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 168, 601-608
- [FER1993] Fery-Forgues S., Fayet JP., Lopez A. (1993). *Drastic changes in the fluorescence properties of NBD probes with the polarity of the medium: involvement of a TICT state?*, Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry, 70, 229-243
- [GHO1968] Ghosh PB., Whitehouse MW. (1968). *7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole: a new fluorogenic reagent for amino acids and other amines*, Biochemical Journal, 108, 155-156
- [GOE1931] Goeppert-Mayer M. (1931). *Über Elementarakte mit zwei Quantensprüngen*, Annalen der Physik, 9, 273-295
- [GRA2010] Gradinaru CC., Marushchak DO., Samim M., Krull UJ. (2009). *Fluorescence anisotropy: from single molecules to live cells*, Analyst, 135, 452-459
- [GRE2006] Greenough KP., Blanchard GJ. (2006). *Quantitating the Dynamics of NBD Hexanoic Acid in Homogeneous Solution and in Solutions Containing Unilamellar Vesicles*, Journal of Physical Chemistry B, 110, 6351-6358

- [GRE2007] Greenough KP., Blanchard GJ. (2007). *Evaluating the Role of Chromophore Side Group Identity in Mediating Solution-Phase Rotational Motion*, Journal of Physical Chemistry A, 111, 558-566
- [GRO2007] Gross M., Winnacker A., Wellmann PJ. (2007). *Electrical, optical and morphological properties of nanoparticle indium-tin-oxide layers*, Thin Solid Films, 515, 8567-8572
- [GRO2011] Grote C. (2011) *Stabilisierte Metalloxid-Nanopartikel Dispersionen*, Institut für Partikeltechnik, E-Mail
- [GRO2012a] Grote C., Chiad KJ., Vollmer D., Garnweitner G. (2002). *Unspecific ligand binding yielding stable colloidal ITO-nanoparticle dispersions*, Chemical Communication, 48, 1464-1466
- [GRO2012b] Grote C., Cheema TA., Garnweitner G. (2012). *Comperative Study of Ligand Binding during the Postsynthetic Stabilization of Metal Oxide Nanoparticles*, Langmuir, 28, 14395-14404
- [GU1995] Gu M., Sheppard CJR. (1995). *Comparison of three-dimensional imaging properties between two-photon and single-photon fliorescence microscopy*, Journal of Microscopy, 177, 128-137
- [HAN2002] Hanson KM., Behne MJ., Barry NF., Mauro TM., Gratton E., Clegg RM. (2002). *Two-photon fluorescence lifetime Imaging oft he skin stratum corneum pH gradient*, Biophysical Journal, 83 (3), 1682-90
- [HAY2010] Hay CE., Marken F., Blanchard GJ. (2010). *Solvent-Dependent Changes in Molecular Reorientation Dynamics: The Role of Solvent-Solvent-Interactions*, Journal of Phisical Chemistry A, 114, 4957-4962
- [HEB1986] Heberer H., Matschiner H. (1986), *UV, visible, and IR spectroscopic studies with N-substituted 4-amino-7-nitrobenzofurazans*, Journal für Praktische Chemie, 328, 261-274
- [HEI2001] Heikal AA., Hess ST., Webb WW. (2001) *Two-photon fluorescence spectroscopy and exited state dynamics of enhanced green fluorescent protein (EGFP): acid-base specificity*, Chemical Physics, 274, 37-55
- [HEL1992] Hell SW. Stelzer EHK. (1992). *Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope*, Journal of the Optical Society of America A: Optics, Image Science, and Vision, Vol. 9, 12, 2159-2166
- [HEL1994] Hell SW., Wichmann J. (1994). *Breaking the diffraction limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Optical Letters, 19, 11, 780-782
- [HOP2001] Hopt A., Neher E. (2001). *Highly nonlinear photodamage in two-photon fluorescence microscopy*, Biophysical Journal, 80, 2029-2036
- [HU1974] Hu CM., Zwanzig R. (1974). *Rotational friction coefficients for speroids with the slipping boundary condition*, Journal of Chemical Physics, 60, 11, 4354-4357
- [IMA1984] Imai K., Toyo'oka T., Miyano H. (1984). *Fluorogenic Reagents for Primary and Secondary Amines and Thiols in High-performance Liquid Chromatography*, Analyst, 109, 1365-1373
- [ITO2005] Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi, T. (2005). *Medical application of*

- functionalized magnetic nanoparticles*, Journal of Biosciences and Bioengineering, 100 (1), 1-11
- [KAI1961] Kaiser W., Garrett C.G.B. (1961). *Two-Photon Excitation in  $\text{Ca:F}_2\text{:Eu}^{2+}$* , Physical Review Letters, Volume 7, Number 6, 229-231
- [KLA1999] Klar TA., Hell SW. (1999). *Subdiffraction resolution in far-field fluorescence microscopy*, Optical Letters, 24, 14. 954-956
- [KRO2010] Kroll S., Treccani L., Rezwani K., Grathwohl G. (2010). *Development and characterization of functionalized ceramic microtubes for bacteria filtration*, Journal of Membrane Science, 365, 447-455
- [KRO2012a] Kroll S. (2012). *Different magnifications of sintered zirconia microtubes*, Advanced Ceramics, E-Mail
- [KRO2012b] Kroll S. (2012). *Protocol-Chemical functionalization of ceramic microtubes*, Advanced Ceramics, E-Mail
- [LAK2006] Lakovic JR. (2006). *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Springer, 3. Auflage
- [LEE2006] Lee H., Lee E., Kim D., Jang NK., Jeong YY., Jon S. (2006). *Antibiofouling polymer-coated supermagnetic iron oxide nanoparticles as potential magnetic resonance contrast agents for in vivo cancer imaging*, Journal of the American Chemical Society, 128 (22), 7383-7389
- [LIN1991] Lin S. Struve WS. (1991). *Time-resolved Fluorescence of Nitrobenzoxadiazole-Aminohexanoic Acid: Effect of Intramolecular Hydrogen-Bonding of Non-radiative Decay*, Photochemistry and Photobiology, Vol. 54, No. 3, 361-365
- [LOU2007] Loura L. MS., Ramalho JP. P. (2007). *Location and dynamics of acyl chain NBD-labeled phosphatidylcholine (NBD-PC) in DPPC bilayers. A Molecular dynamics and time-resolved fluorescence anisotropy study*, Biochimica et Biophysica Acta, 1768, 467-478
- [MAI1960] Maiman TH. (1960). *Stimulated Optical Radiation in Ruby*, Nature, 1987, 4736, 493-494
- [MAR1963] Marquardt DW. (1963). *An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters*, Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics, Vol. 11, No. 2, 431-441
- [MAZ1996] Mazères S., Schram V., Tocanne JF., Lopez A. (1993). *7-Nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole-4-yl-Labeled Phospholipids in Lipid Membranes: Differences in Fluorescence Behaviour*, Biophysical Journal, Volume 71, 327-335
- [McC1972] McClain WM. (1972). *Excited State Symmetry Assignment Through Polarized Two-Photon Adsorption Studies of Fluids*, The Journal of Chemical Physics, 55 (6), 2789-2796
- [McC1974] McClain WM. (1974). *Two-Photon Molecular Spectroscopy*, Accounts of Chemical Research, Volume 7, Number 5, 129-135
- [MOR1988] Mori J., Kaino T. (1988). *Molecular orbitals in benzoxadiazole compounds with optical nonlinearities*, Physical Letters A, 27, 5, 259-262
- [MUK1994] Mukherjee S., Chattopadhyay A., Samanta A., Soujanya T. (1994). *Dipole Moment*

- Change of NBD Group upon Excitation Studied Using Solvatochromic and Quantum Chemical Approaches: Implications in Membrane Research*, Journal of Physical Chemistry, 98, 2809-2812
- [NAG1963] Nagakura S. (1963). *Electronic spectra and electron transfer interaction between electron donor and acceptor*, Pure Applied Chemistry, 7, 1, 79-92
- [NEO2008] Neouze MA., Schubert U. (2008). *Surface modification and functionalization of metal and metal oxide nanoparticles by organic ligands*, Monatshefte für Chemie, 139 (2), 183-195
- [NIE2007] Nie S., Xing Y., Kim GJ., Simons JW. (2007). *Nanotechnology applications in cancer*, Annual Review of Biomedical Engineering, 9, 257-288
- [PEA2008] Peatross J., Ware M. (2013). *Physics of Light and Optics*, Birmingham Young University, optics.byu.edu
- [PER1934] Perrin F. (1934). *Movement brownien d'un ellipsoïde – I. Dispersion diélectrique pour des molécules ellipsoïdales*, Journal de Physique et Le Radium, Volume 5, Nr. 10, 497-511
- [REI1979] Reichardt C. (1979). *Empirical Parameters of Solvent Polarity as Linear Free-Energy Relationships*, Angewandte Chemie Internationale Edition England, 18, 98-110
- [REI1994] Reichardt C. (1994). *Solvatochromic Dyes as Solvent Polarity Indicators*, Chemical review, 94 (8), 2319-2358
- [REM2010] Rempfer M. (2010). *Plasmafunktionalisierung von Hohlfasermembranen*, Gambro GmbH, Hechingen, E-Mail
- [RET1988] Rettig W. (1988). *Photophysical and Photochemical Switches Based on Twisted Intramolecular Charge Transfer (TICT) States*, Applied Physics B, 45, 145-149
- [RIC1959] Richards B., Wolf E. (1959). *Electromagnetic Diffraction in Optical Systems. 2. Structure of the Image Field*, Proceedings of the Royal Society A Mathematical Physical and Engineering Sciences, 253, 358-379
- [SHE1990] Scheppard CJR., Gu M. (1990). *Image Formation in 2-photon fluorescence microscopy*, Optik, 86, 104-106
- [SIE2003] Siegel J., Suhling K., Lévêque-Fort S., Webb SED., Davis DM., Phillips D., Sabharwal Y., French PMW. (2003). *Wide-field time-resolved fluorescence anisotropy imaging (TR-FAIM): Imaging the rotational mobility of a fluorophore*, Review of Scientific Instruments, 74, 182-192
- [SMA1977] Small EW., Isenberg I. (1977). *Hydrodynamic properties of a rigid molecule: rotational and linear diffusion and fluorescence anisotropy*, Biopolymers, 16, 1907-1113
- [STE1974] Stein S., Bohlen P., Udenfriend S. (1974). *Studies on the kinetics of reaction and hydrolysis of fluorescamine*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 163, 400-403
- [STU2007] Stuart AR., Amstad E., Gauckler LJ. (2007). *Colloidal stabilization of nanoparticles in concentrated suspensions*, Langmuir, 23 (3), 1081-1090
- [SUH2005] Suhling K., French PMW., Phillips D. (2005). *Time-resolved fluorescence microscopy*, Photophysical and Photobiological Sciences, 4, 13-22

- [TAK2008] Takabayashi T., Wang HP., Kinjo M., Ohta N. (2008). *Application of fluorescence lifetime imaging on enhanced green fluorescent protein to intracellular pH measurements*, Photochemical and Photobiological Sciences, 7 (6), 668-670
- [TES2002] Tessler, N., Medvedev, V., Kazes, M., Kan, S., Banin, U. (2002). *Efficient Near-Infrared Polymer Nanocrystal Light-Emitting Diode*, Science, 295,1506–1508
- [THE2003] Theer P., Hasan MT., Denk W. (2003). *Two-photon Imaging to depth of 1000  $\mu\text{m}$  in living brains by use of a  $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$  regenerative amplifier*, Optical Letters, 28, 1022-1024
- [TOY1984] Toyo'oka T., Watanabe Y., Iami K. (1984). *Reaction of amines of biological importance with 4-fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole*, Analytica Chimica Acta, 149, 305-3012
- [UCH2003] Uchiyama S., Takehira K., Kothani S., Imai K., Nakagaki R., Tobita S., Santa T. (2003). *Fluorescence on-off switching mechanism of benzofurazans*, Organic and Biomolecular Chemistry, 1, 1067-1072
- [UDE1972] Udenfriend S., Stein S., Bohlen P., Bairman W., Leimgruber W., Weigele M. (1972). *Fluorescamine: A Reagent Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins, and Primary Amines in the Picomole Range*, Science, 178, 871-872
- [WEI2010] Weinreis SA., Ellis JP., Cavagnero S. (2010). *Dynamic fluorescence depolarization: A powerful tool to explore protein folding on the ribosome*, Methods, 52, 57-73
- [WER2014] Werner J., Besser B., Brandes C., Kroll S., Rezwan K. (2014). *Production of ceramic membranes with different pore sizes for virus retention*, Journal of Water Process Engineering, 4, 201-2011
- [XU1996] Xu C., Zopf W., Shear JB., Williams RM, Webb WW. (1996). *Multiphoton fluorescence excitation: new spherival windows for biological nonlinear microscopy*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 93, 20, 10763-10768
- [YU2008] Yu Q., Proia M., Heikal AA. (2008). *Integrated biophysics approach for noninvasive and multiscale studies of biomolecular and cellular biophysics*, Journal of Biomedical Optics, 13, 4,
- [ZELL2013] Zellmer S. (2013). *Versuchsverlauf – Photonenspektroskopie*, E-Mail, Institut für Partikeltechnik, TU Braunschweig
- [ZEL2014a] Zellmer S. (2014). *Abhängigkeit der Stabilisierung vom Lösungsmittel*, E-Mail, Institut für Partikeltechnik, TU Braunschweig
- [ZEL2014b] Zellmer S. (2014). *Private Mitteilung*, Institut für Partikeltechnik, TU Braunschweig
- [ZIP2003] Zipfel WR., Williams RM., Webb WW. (2003). *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*, Nature Biotechnology, 21, 11, 1369-1376

## 9 Anhang

### 9.1 Imaging von Aminogruppen auf plasmaaminierten Hohlfasermembranen

Hier sind im Folgenden weitere Querschnittsbilder der Fluoreszenzintensität verschiedener Hohlfasermembrane mit dazugehörigem Profil dargestellt. Diese kleine Auswahl soll zumindest einen Einblick in die Varianz der Aminogruppenverteilung in den Membranen geben.

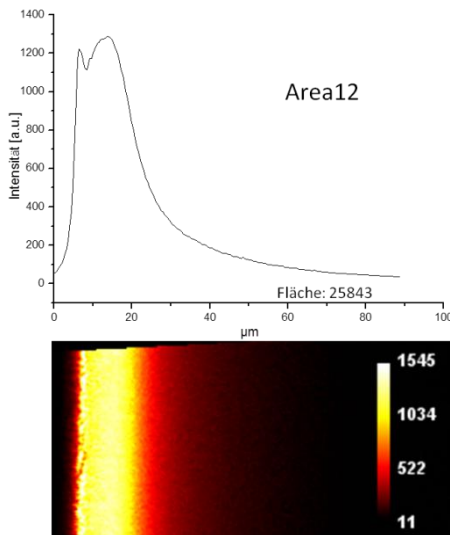


Abb. 9-1 Membran aus Probe 1

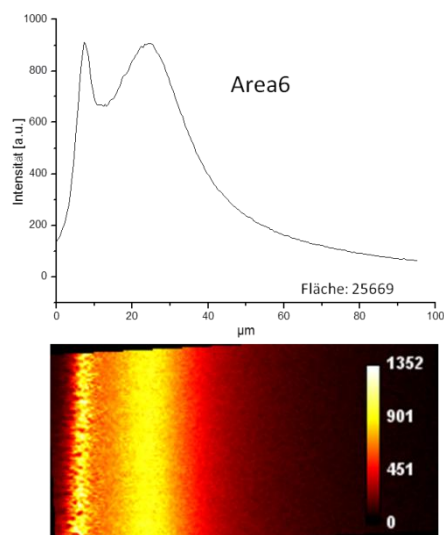


Abb. 9-2 Membran aus Probe 2

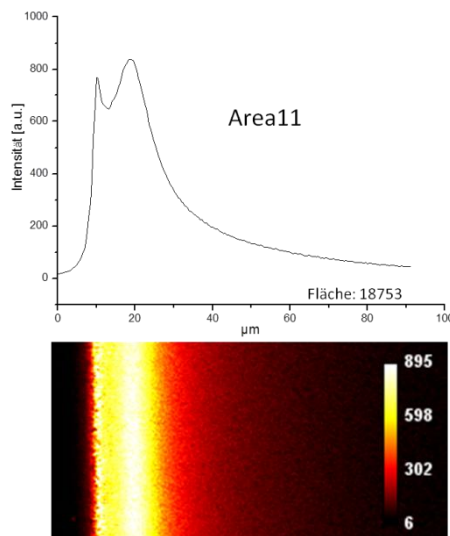


Abb. 9-3 Membran aus Probe 4

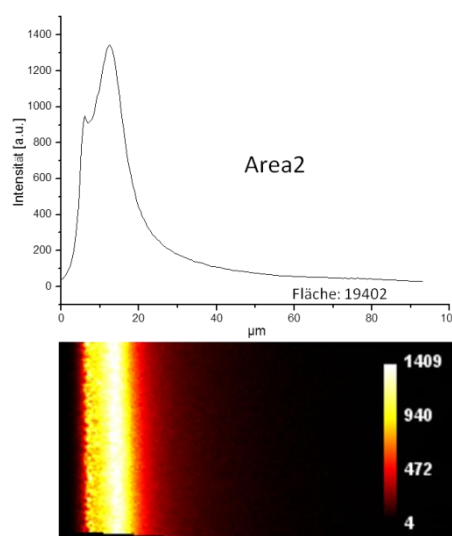


Abb. 9-4 Membran aus Probe 4

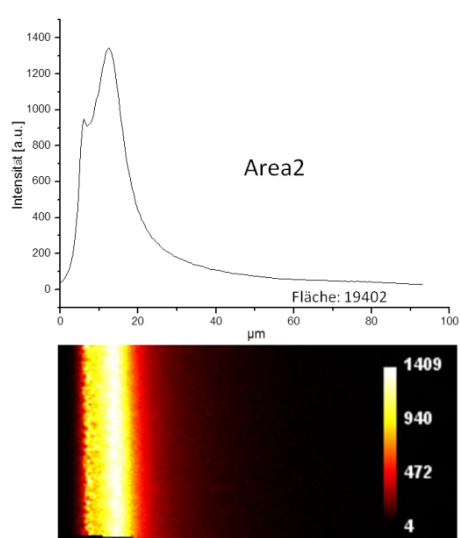


Abb. 9-5 Membran aus Probe 5

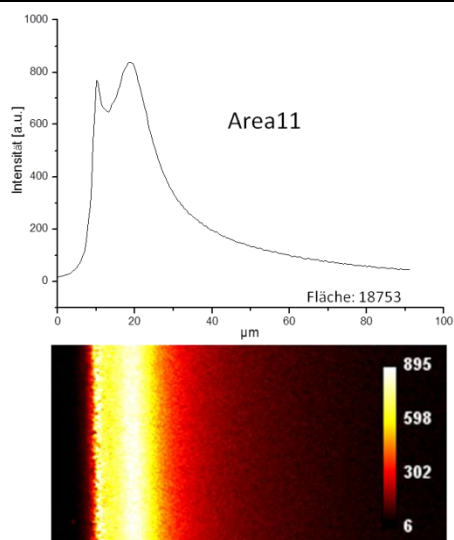


Abb. 9-6 Membran aus Probe 6

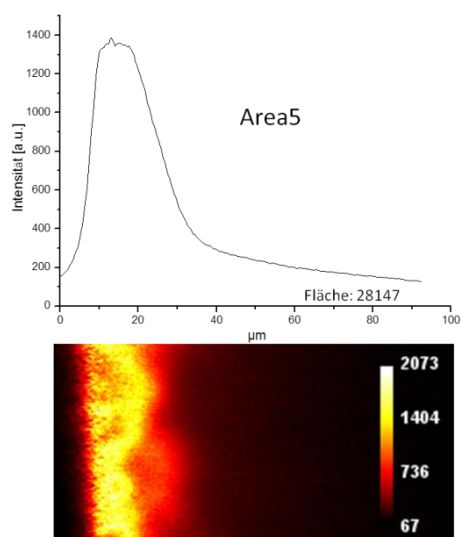


Abb. 9-7 Membran aus Probe 8

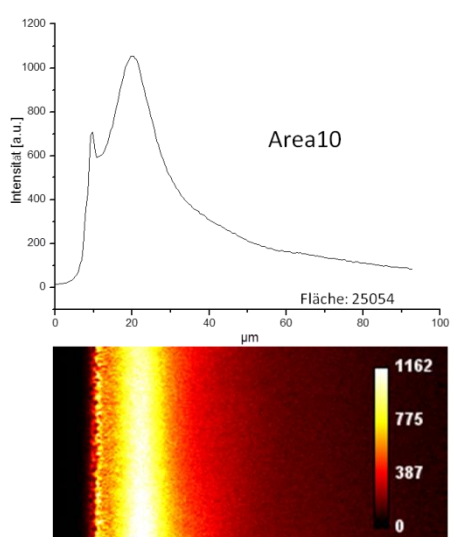


Abb. 9-8 Membran aus Probe 7

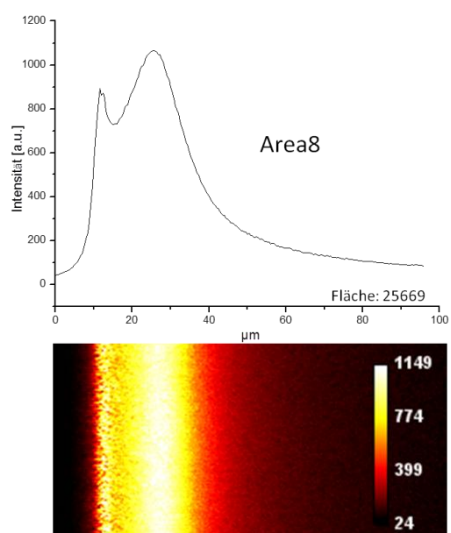


Abb. 9-9 Membran aus Probe 9

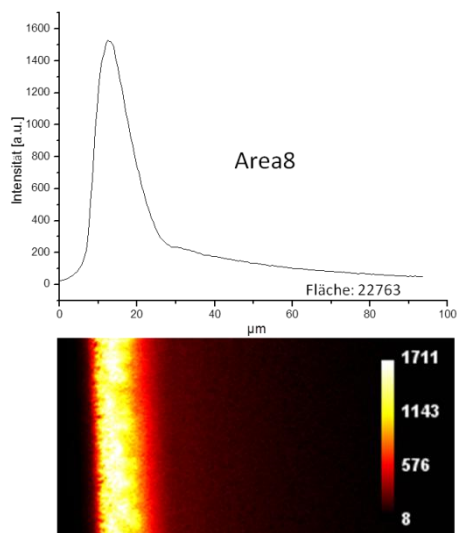
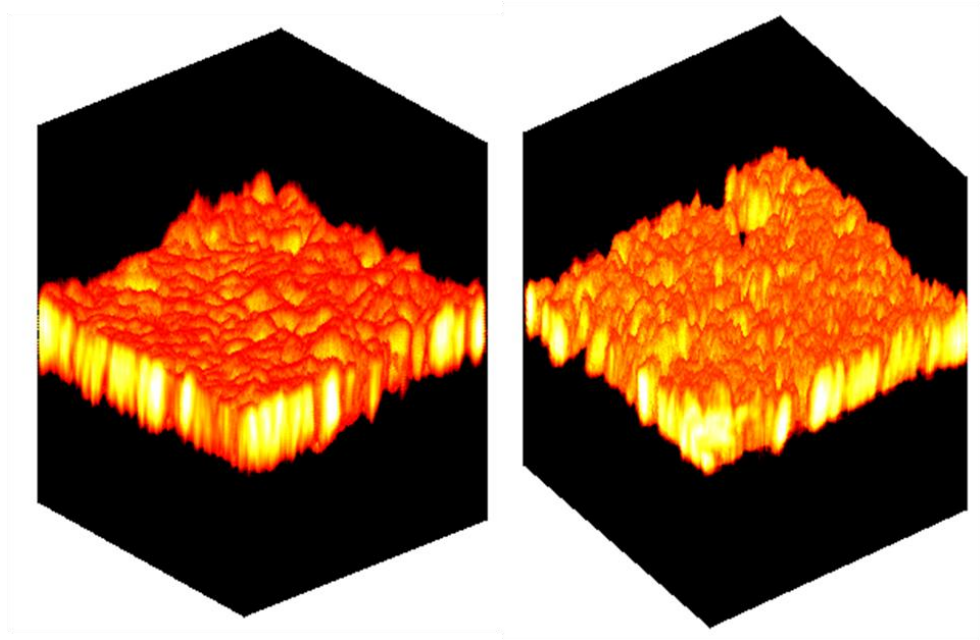


Abb. 9-10 Membran aus Probe 8

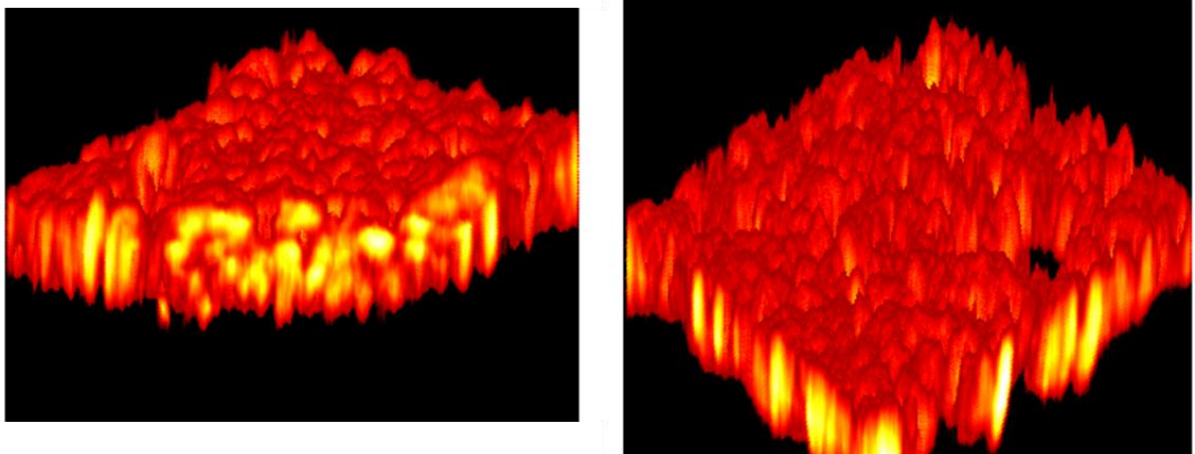


## 9.2 3D Imaging von Aminogruppen auf Keramikröhrchen

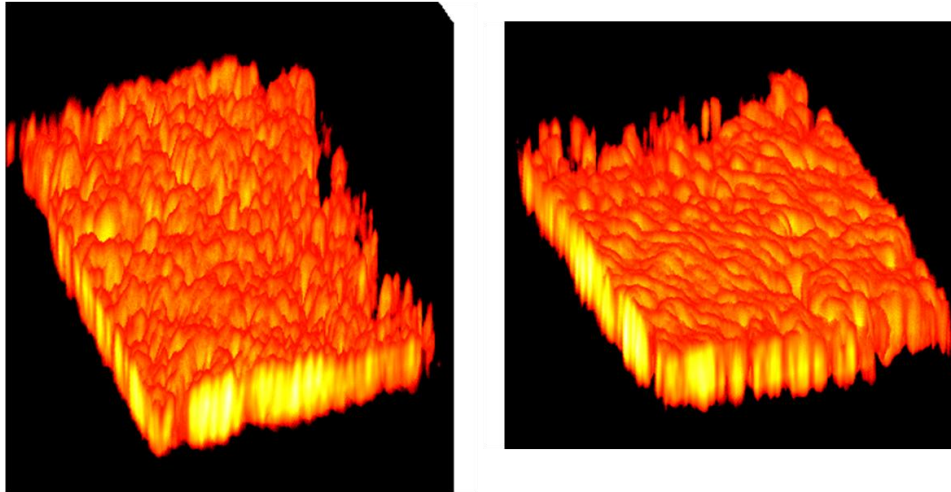
An dieser Stelle werden die generierten 3D Bilder aus den aufgenommenen z-Scans dargestellt. Aus diesen Daten wurden die in Kapitel 5.3 angegebenen Behandlungstiefen mittels Lorentzfit berechnet.



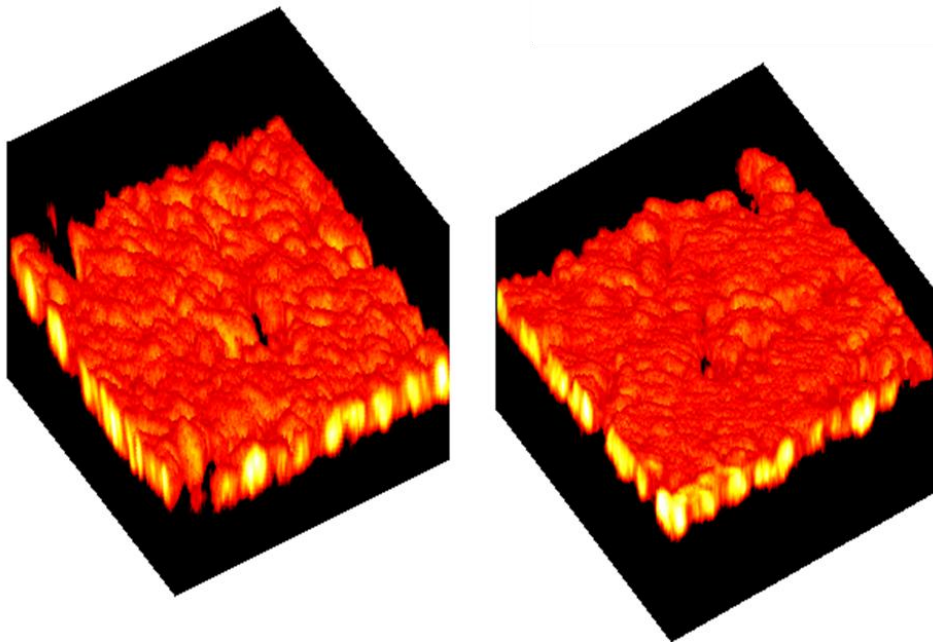
**Abb. 9-5** gerendertes 3D-Bild eines  $115 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Außenkante eines mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr. 2)



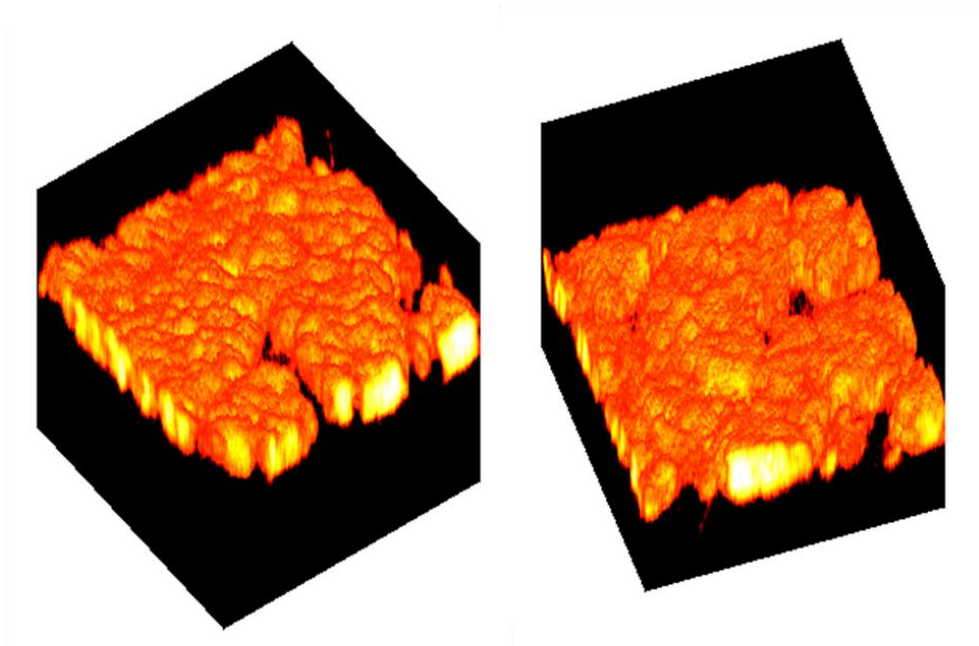
**Abb. 9-12** gerendertes 3D-Bild eines Tiefenscans von der Innenseite eines mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten



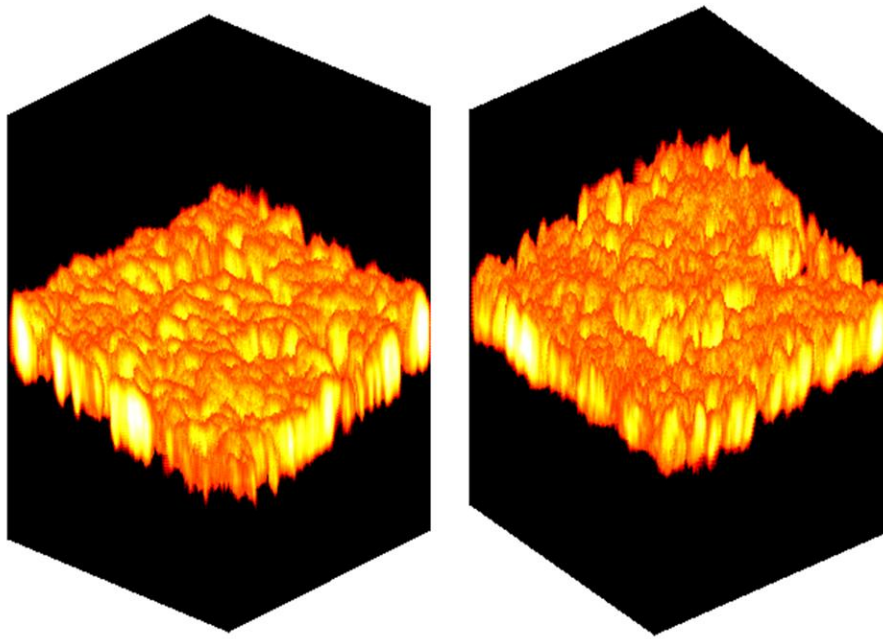
**Abb. 9-6** gerendertes 3D-Bild eines  $215 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Innenseite eines mit APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr.2)



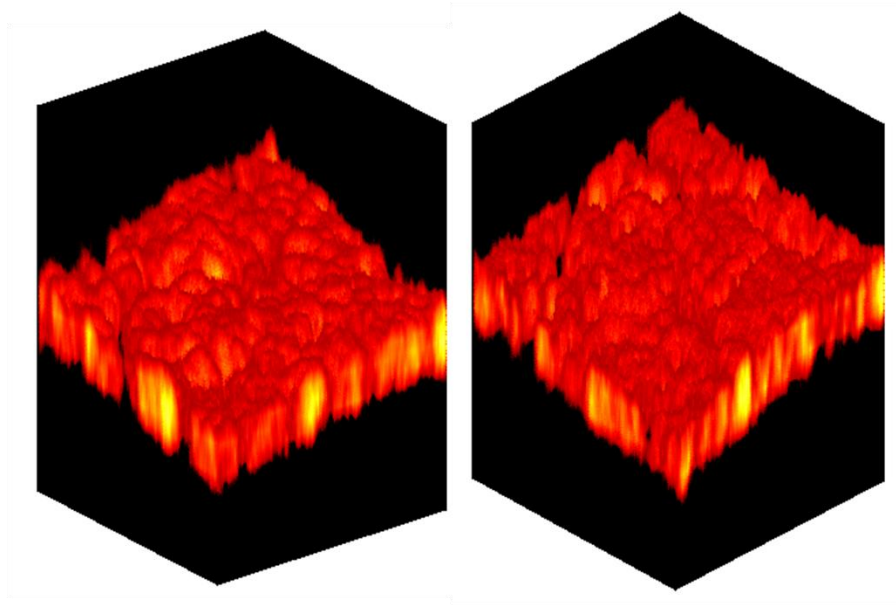
**Abb. 9-7** gerendertes 3D-Bild eines  $110 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Aussenseite eines mit AE-APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr. 1)



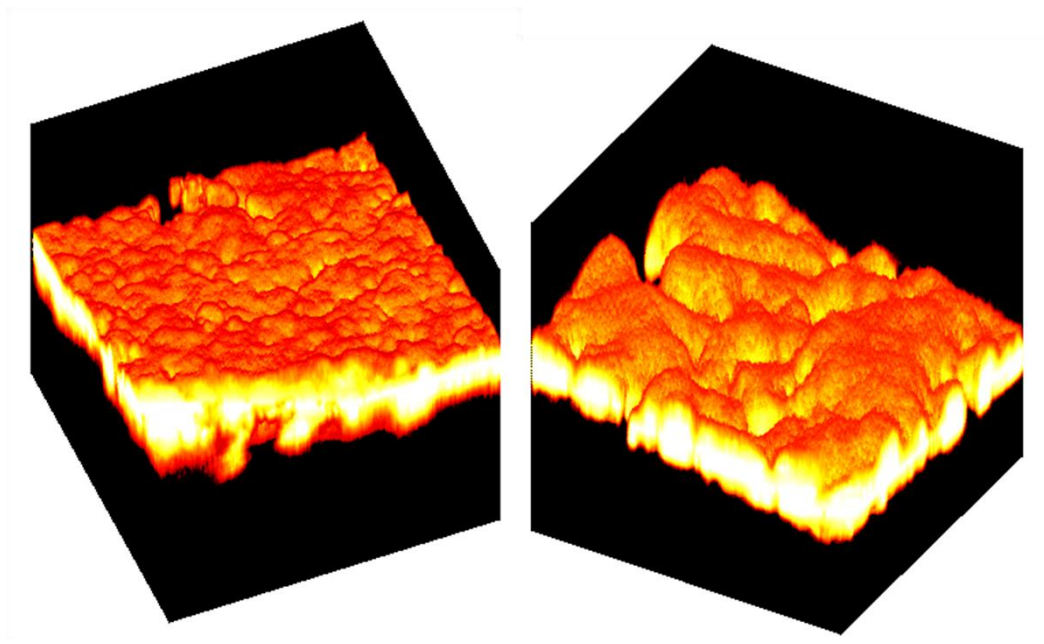
**Abb. 9-85** gerendertes 3D-Bild eines  $110 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Aussenseite eines mit AE-APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr. 2)



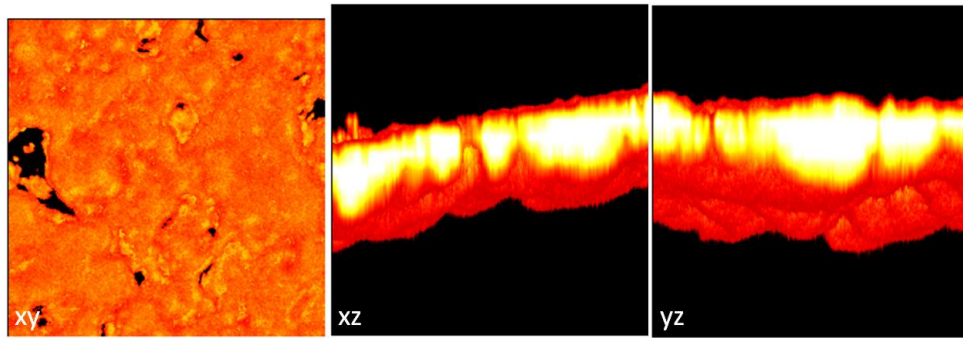
**Abb. 9-96** gerendertes 3D-Bild eines  $135 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Innenseite eines mit AE-APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr. 1)



**Abb. 9-10** gerendertes 3D-Bild eines  $125 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Innenseite eines mit AE-APTES funktionalisierten und mit NBD-F gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten (Nr. 2)



**Abb. 9-118** gerendertes 3D-Bild eines  $100 \times 80 \times 80 \mu\text{m}^3$  Tiefenscans von der Innenseite eines mit APTES funktionalisierten und mit Fluram gelabelten Keramikröhrchens, auf der linken Seite von oben und auf der rechten Seite von unten



**Abb. 9-19** Seitenansichten zum in Abbildung 9-18 gezeigten 3D Bild

### 9.3 Nanopartikel

An dieser Stelle werden weitere Ergebnisse aus den Fluoreszenzlebensdauermessungen und den Anisotropiezerfallsanalysen der stabilisierten ITO- und  $\text{ZrO}_2$ -Nanopartikel aus den Kapiteln 6.4 und 6.5 dargestellt.

**Tab. 9.1** Fitergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Amylamin stabilisierten ITO-Partikel bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1, reine Stabilisatorlösungen (oben) und Partikeldispersionen (unten)

Amylamin	$r_0$	$\pm$	$\theta$ [ns]	$\pm$
<b>Amylamin</b>				
s	0,082	0,004	0,12	0,01
1:1	0,083	0,005	0,10	0,05
1:3	0,075	0,005	0,12	0,01
1:4	0,073	0,005	0,13	0,01
1:5	0,069	0,009	0,12	0,01
1:10	0,072	0,004	0,12	0,01
1:20	0,074	0,003	0,12	0,01
1:30	0,072	0,002	0,12	0,00
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,080	0,009	0,12	0,01
1:1	0,073	0,015	0,12	0,03
1:3	0,067	0,009	0,13	0,01
1:4	0,072	0,007	0,12	0,01
1:5	0,068	0,007	0,13	0,01
1:10	0,077	0,006	0,12	0,01
1:20	0,073	0,006	0,12	0,01
1:30	0,077	0,007	0,12	0,01

**Tab. 9.2** Fitergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Heptylamin stabilisierten ITO-Partikel bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1, reine Stabilisatorlösungen (oben) und Partikeldispersionen (unten)

Heptylamin	$r_0$	$\pm$	$\theta$ [ns]	$\pm$
<b>Heptylamin</b>				
s	0,083	0,004	0,14	0,05
1:1	0,082	0,010	0,15	0,01
1:3	0,068	0,014	0,14	0,01
1:4	0,072	0,007	0,14	0,01
1:5	0,069	0,007	0,15	0,01
1:10	0,074	0,008	0,14	0,01
1:20	0,067	0,007	0,15	0,01
1:30	0,066	0,008	0,15	0,01
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,072	0,009	0,15	0,03
1:1	0,071	0,011	0,15	0,02
1:3	0,065	0,014	0,16	0,04
1:4	0,070	0,009	0,14	0,01
1:5	0,069	0,013	0,15	0,02
1:10	0,068	0,013	0,14	0,01
1:20	0,069	0,011	0,15	0,02
1:30	0,071	0,012	0,14	0,01

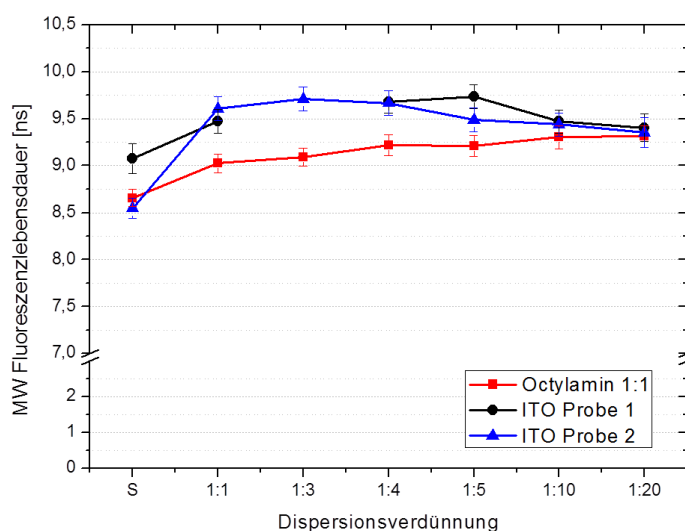
**Tab. 9.3** Fitergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Octylamin stabilisierten ITO-Partikel bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1, reine Stabilisatorlösungen (oben) und Partikeldispersionen (unten)

Octylamin	$r_0$	$\pm$	$\theta$ [ns]	$\pm$
<b>Octylamin</b>				
s	0,082	0,005	0,17	0,01
1:1	0,084	0,002	0,15	0,01
1:3	0,082	0,003	0,15	0,01
1:4	0,088	0,005	0,15	0,01
1:5	0,080	0,004	0,15	0,01
1:10	0,080	0,006	0,14	0,00
1:20	0,082	0,003	0,14	0,01
1:30	0,083	0,004	0,15	0,01
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,068	0,005	0,13	0,01
1:1	0,076	0,003	0,14	0,01
1:3	0,093	0,017	0,22	0,09
1:4	0,078	0,005	0,15	0,01
1:5	0,068	0,007	0,15	0,02
1:10	0,072	0,006	0,15	0,01
1:20	0,077	0,007	0,15	0,01
1:30				



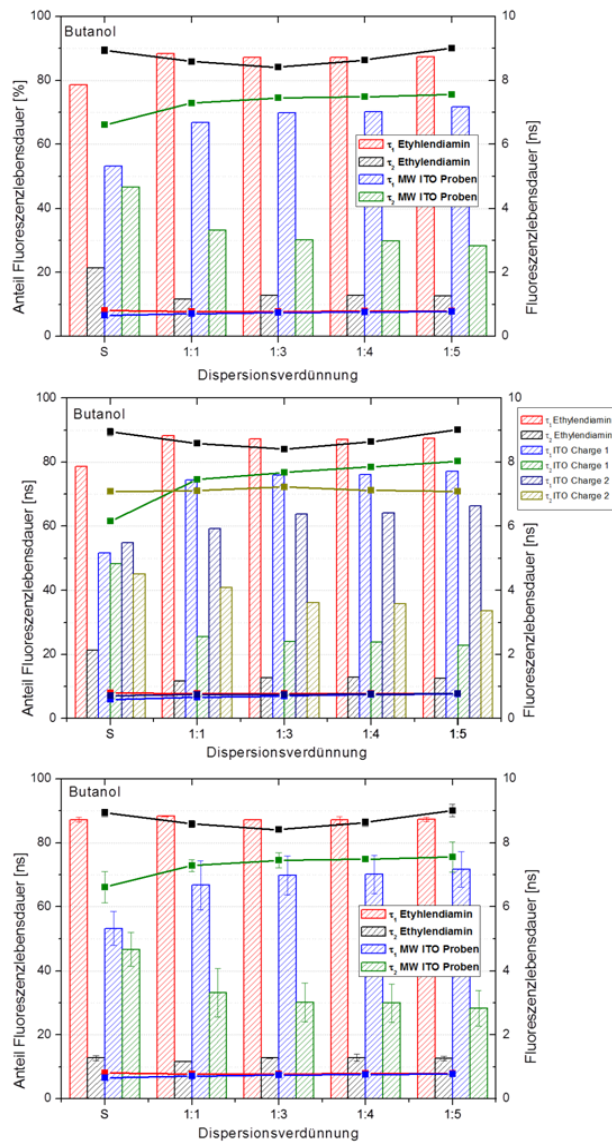
**Tab. 9.4** Fitergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Dodecylamin stabilisierten ITO-Partikel bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1, reine Stabilisatorlösungen (oben) und Partikeldispersionen (unten)

Dodecylamin	$r_0$	$\pm$	$\theta$ [ns]	$\pm$
<b>Dodecylamin</b>				
s	0,102	0,002	0,18	0,00
1:1	0,097	0,007	0,16	0,07
1:3	0,091	0,009	0,18	0,02
1:4	0,086	0,007	0,18	0,02
1:5	0,092	0,003	0,17	0,01
1:10	0,087	0,004	0,18	0,01
1:20	0,082	0,007	0,17	0,01
1:30	0,084	0,004	0,17	0,01
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,088	0,009	0,13	0,01
1:1	0,079	0,014	0,16	0,05
1:3	0,088	0,008	0,16	0,01
1:4	0,083	0,004	0,18	0,01
1:5	0,084	0,004	0,17	0,01
1:10	0,085	0,005	0,17	0,00
1:20	0,080	0,005	0,18	0,01
1:30	0,080	0,004	0,18	0,01

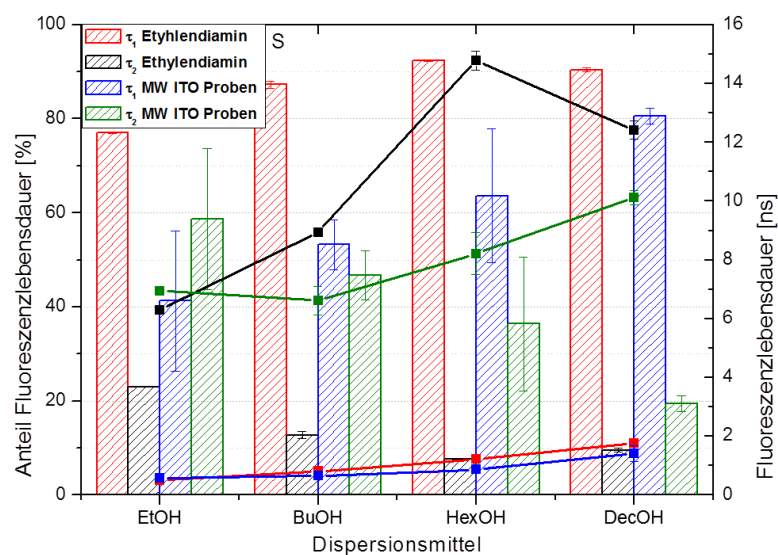


**Abb. 9-12** Fluoreszenzlebensdaueranalyse der Octylamin-ITO Dispersionen im Stabilisator/Partikel-Verhältnis 1:1

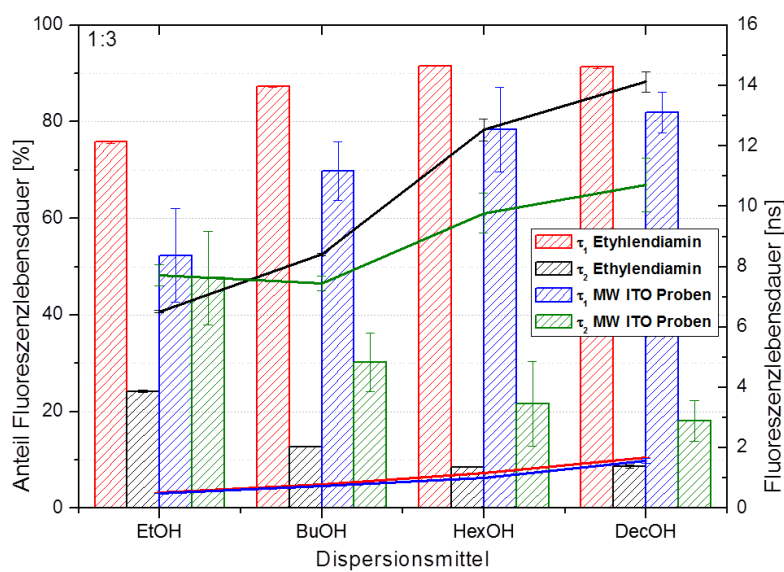




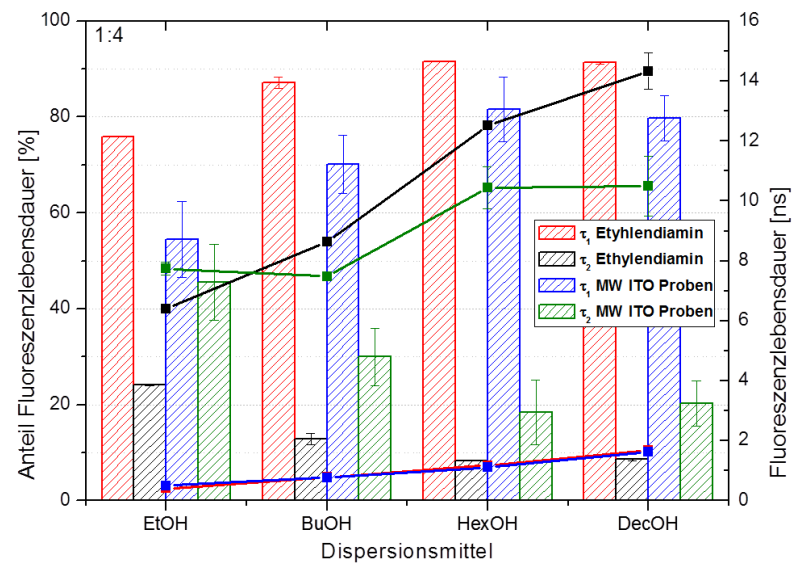
**Abb. 9-13** Vergleich verschiedener Darstellungsmöglichkeiten der Messergebnisse aus der Fluoreszenzlebensdaueranalyse der mit Diaminen stabilisierten ITO Dispersionen:  
 Angabe der Mittelwerte der Lebensdauer über beide Chargen mit statistischer Abweichung vom Mittelwert, da dieser größer ist als der gemittelte Fehler der Fits und Verzicht auf Angabe der Abweichung vom Mittelwert bei den relativen Anteilen (oben),  
 Darstellung beider Chargen einzeln nebeneinander mit jeweiligem Mittelwert der Fluoreszenzlebensdauer und Angabe des mittleren Fehlers des Fits (Mitte),  
 statistische Darstellung der Lebensdauern und dessen Anteile für beide Chargen. Hier wurden die 5 Messungen aus Charge 1 und die 5 Messungen aus Charge 2 gleichwertig behandelt und der statistische Mittelwert und die Abweichung vom Mittelwert als Fehler angegeben. Da es eine Varianz zwischen den Chargen gibt sind die Fehler dementsprechend größer, können so aber auch nicht unterschätzt werden (unten)



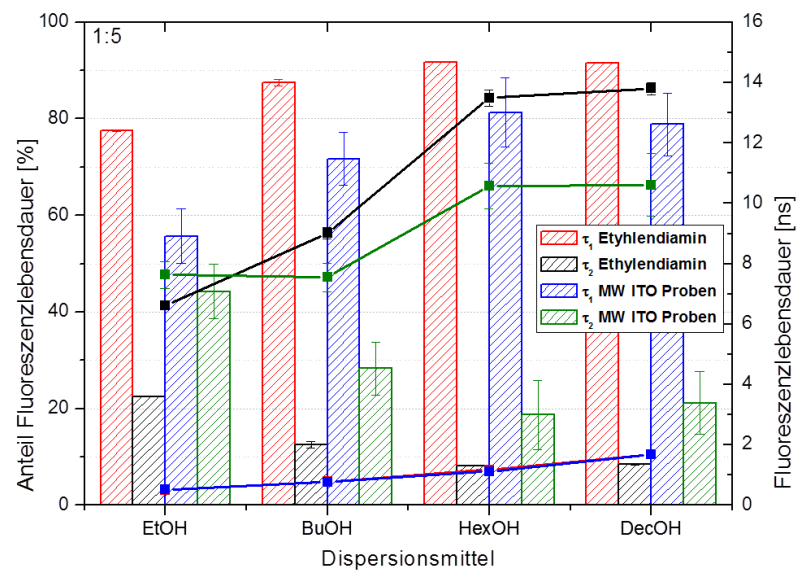
**Abb. 9-14** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstanter Dispersionsverdünnung von S



**Abb. 9-15** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstanter Dispersionsverdünnung von 1:3



**Abb. 9-16** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstanter Dispersionsverdünnung von 1:4



**Abb. 9-17** Untersuchung des Lösungsmiteleinflusses auf die Fluoreszenzlebensdauer bei konstanter Dispersionsverdünnung von 1:5

**Tab. 9.5** Fitergebnisse aus der Anisotropiezerfallsanalyse für die mit Ethylendiamin stabilisierten ITO-Partikel bei einem Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 1:1 in verschiedenen Lösungsmitteln, reine Stabilisatorlösungen (oben) und Partikeldispersionen (unten)

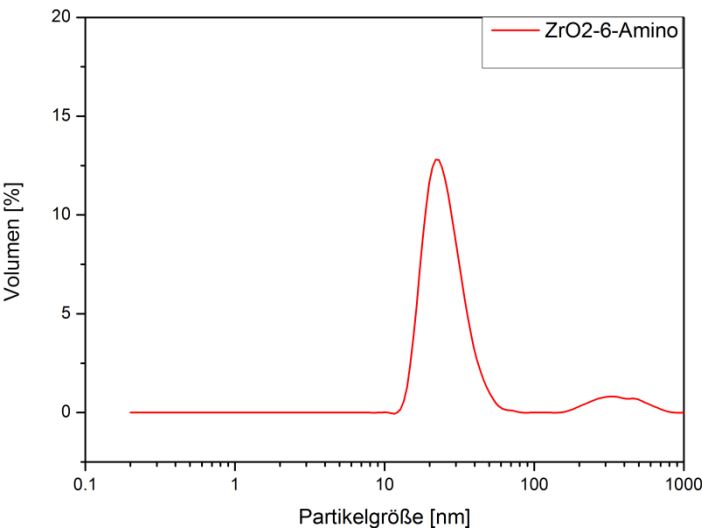
Ethanol	$r_0$	$\pm$	$\Theta$ [ns]	$\pm$
<b>Ethylendiamin</b>				
s	0,247	0,010	0,19	0,01
1:1	0,267	0,010	0,17	0,01
1:3	0,220	0,044	0,21	0,04
1:4	0,214	0,007	0,19	0,01
1:5	0,228	0,007	0,19	0,00
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,223	0,017	0,16	0,02
1:1	0,236	0,024	0,18	0,01
1:3	0,226	0,008	0,18	0,02
1:4	0,213	0,016	0,19	0,01
1:5	0,204	0,014	0,18	0,01

Hexanol	$r_0$	$\pm$	$\Theta$ [ns]	$\pm$
<b>Ethylendiamin</b>				
s	0,287	0,003	0,47	0,00
1:1	0,271	0,003	0,45	0,01
1:3	0,268	0,004	0,48	0,05
1:4	0,267	0,003	0,46	0,01
1:5	0,290	0,010	0,45	0,00
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,233	0,017	0,30	0,05
1:1	0,247	0,010	0,33	0,06
1:3	0,274	0,006	0,36	0,03
1:4	0,256	0,009	0,42	0,02
1:5	0,270	0,008	0,41	0,02

Butanol	$r_0$	$\pm$	$\Theta$ [ns]	$\pm$
<b>Ethylendiamin</b>				
s	0,252	0,008	0,30	0,37
1:1	0,250	0,057	0,32	0,01
1:3	0,259	0,003	0,33	0,01
1:4	0,263	0,014	0,19	0,13
1:5	0,260	0,011	0,30	0,01
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,232	0,009	0,23	0,04
1:1	0,246	0,007	0,23	0,08
1:3	0,253	0,007	0,27	0,02
1:4	0,255	0,005	0,28	0,01
1:5	0,254	0,008	0,28	0,01

Decanol	$r_0$	$\pm$	$\Theta$ [ns]	$\pm$
<b>Ethylendiamin</b>				
s	0,289	0,004	0,87	0,02
1:1	0,290	0,002	0,79	0,02
1:3	0,297	0,002	0,80	0,02
1:4	0,302	0,002	0,85	0,08
1:5	0,279	0,002	0,80	0,00
<b>MW ITO Proben</b>				
s	0,270	0,012	0,57	0,26
1:1	0,273	0,007	0,66	0,16
1:3	0,276	0,005	0,75	0,15
1:4	0,283	0,004	0,79	0,17
1:5	0,281	0,006	0,82	0,13

**6-Aminohexansäure**



**Abb. 9-18** DLS Messung einer mit 6-Aminohexansäure stabilisierten ZrO<sub>2</sub>-Partikelsdispersion, gemessen am IPAT in Braunschweig

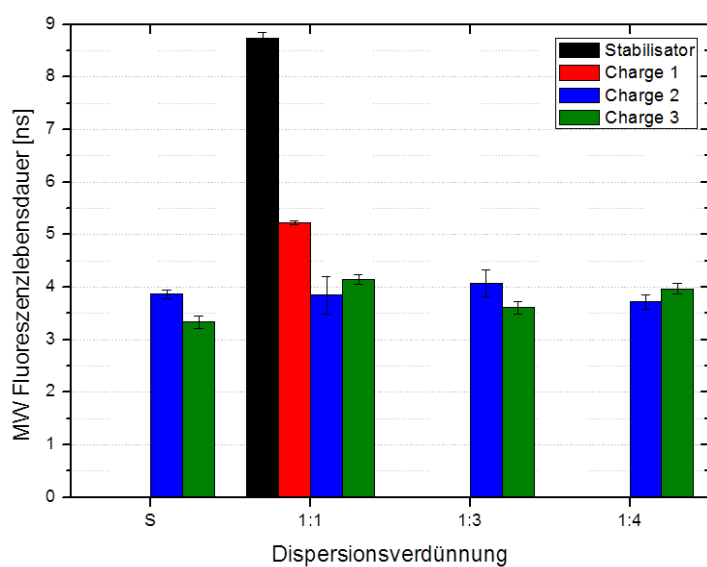
**6-Aminohexansäure 0,2:1**

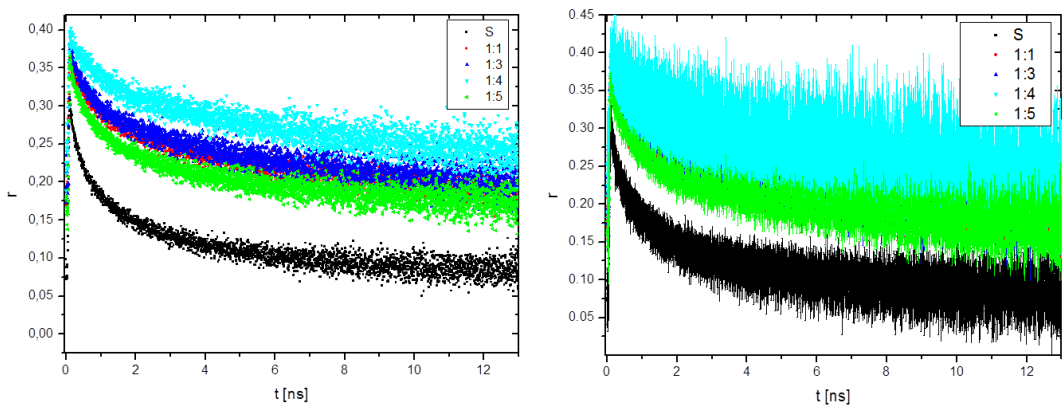
**Tab. 9.6** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven aus Charge 2

Probe	$g_1$ ±	$\theta_1$ ±	$g_2$ ±	$\theta_2$ ±	$g_\infty$ ±	$r_0$ ±
	%	ns	%	ns	%	
S	31 6	0,60 0,06	39 3	3,88 0,53	30 9	0,273 0,076
1:1	41 5	0,34 0,05	41 7	1,86 0,35	18 12	0,192 0,017
1:3	35 2	0,82 0,58	34 1	2,84 0,59	31 3	0,244 0,019
1:4	26 4	0,50 0,11	24 6	3,47 1,22	50 10	0,279 0,068
1:5	36 5	0,54 0,12	28 3	4,71 2,39	36 4	0,315 0,016

**Tab. 9.7** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven aus Charge 3

Probe	$g_1$ ±	$\theta_1$ ±	$g_2$ ±	$\theta_2$ ±	$g_\infty$ ±	$r_0$ ±
	%	ns	%	ns	%	
<b>S</b>	50 8	0,40 0,09	34 5	2,32 0,43	17 11	0,263 0,039
<b>1:1</b>	41 7	0,68 0,19	31 9	1,67 0,94	28 13	0,203 0,043
<b>1:3</b>	36 7	0,43 0,06	30 4	2,64 0,73	34 10	0,3 0,025
<b>1:4</b>	38 6	0,44 0,12	33 6	3,42 1,37	29 10	0,264 0,034
<b>1:5</b>	31 4	0,48 0,09	35 3	4,22 1,05	34 6	0,313 0,051

**6-Aminohexansäure 0,02:1****Abb. 9-19** Fluoreszenzlebensdauer der der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben verschiedener Chargen

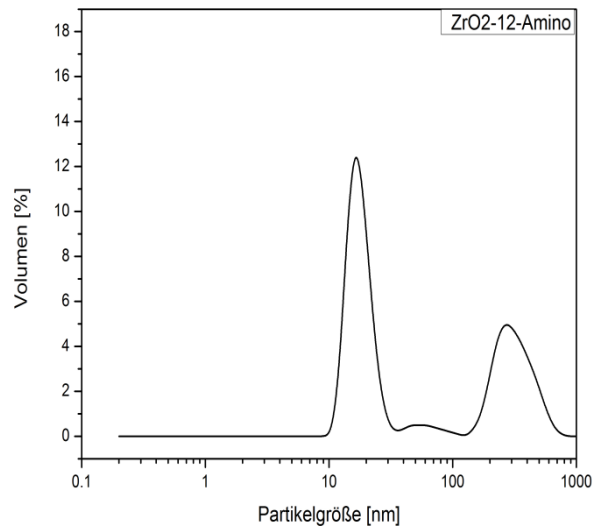


**Abb. 9-20** Anisotropiezerfallskurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikel-Verhältnis von 0, 02:1 stabilisierten Proben aus Charge 3: Mittelwerte der Einzelmessungen (links), Mittelwerte der Einzelmessungen mit Standardabweichung (rechts)

**Tab. 9.8** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven der mit 6-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0,02:1 stabilisierten Proben aus Charge 3

Probe	$g_1 \pm$	$\theta_1 \pm$	$g_2 \pm$	$\theta_2 \pm$	$g_\infty \pm$	$r_0 \pm$
	%	ns	%	ns	%	
S	39 2	0,52 0,06	35 4	3,70 0,33	26 2	0,312 0,009
1:1	22 1	0,75 0,06	30 1	6,30 0,54	48 2	0,365 0,005
1:3	22 2	0,65 0,04	30 3	5,81 1,17	49 5	0,382 0,006
1:4	18 2	0,68 0,10	28 1	6,30 0,99	54 2	0,385 0,009
1:5	27 3	0,63 0,05	28 2	4,87 0,74	46 2	0,361 0,001

### 12-Aminododecansäure



**Abb. 9-29** DLS Messung einer mit 12-Aminododecansäure stabilisierten ZrO<sub>2</sub> Partikelsdispersion, gemessen am IPAT in Braunschweig

### 12-Aminododecansäure 0,2:1

**Tab. 9.9** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven der mit 12-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0, 2:1 stabilisierten Proben aus Charge 1

Probe	$g_1$	$\pm$	$\theta_1$	$\pm$	$g_2$	$\pm$	$\theta_2$	$\pm$	$g_\infty$	$\pm$	$r_0$	$\pm$
	%		ns		%		ns		%			
<b>S</b>	46	14	0,44	0,07	27	3	3,53	0,92	28	17	0,237	0,058
<b>1:1</b>	0	0	0,00	0,00	0	0	0,00	0,00	0	0	0	0
<b>1:3</b>	34	3	0,53	0,04	30	1	4,55	0,15	36	4	0,294	0,027
<b>1:4</b>	42	2	0,44	0,05	28	2	3,25	0,66	30	4	0,298	0,032
<b>1:5</b>	38	3	0,48	0,03	24	3	3,78	0,89	38	5	0,23	0,079



**Tab. 9.10** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven der mit 12-Aminohexansäure im Stabilisator/Partikelverhältnis von 0, 2:1 stabilisierten Proben aus Charge 2

Probe	$g_1$ ± %	$\theta_1$ ± ns	$g_2$ ± %	$\theta_2$ ± ns	$g_\infty$ ± %	$r_0$ ±
S	49 7	0,48 0,08	34 5	3,53 0,66	23 17	0,215 0,042
1:1	37 6	0,43 0,03	28 2	3,88 0,71	35 8	0,345 0,044
1:3	20 5	0,75 0,07	23 4	6,76 1,09	58 8	0,283 0,085
1:4	43 19	0,40 0,09	23 4	2,83 0,81	34 15	0,232 0,075
1:5	48 6	0,42 0,04	32 6	3,07 0,73	20 12	0,245 0,061

**12-Aminododecansäure 0,1:1****Tab. 9.11** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven aus Charge 1

Probe	$g_1$ ± %	$\theta_1$ ± ns	$g_2$ ± %	$\theta_2$ ± ns	$g_\infty$ ± %	$r_0$ ±
S	45 1	0,42 0,01	29 1	3,04 0,05	26 2	0,302 0,008
1:1	33 2	0,51 0,01	30 2	4,73 0,35	37 3	0,299 0,04
1:3	42 7	0,43 0,06	27 4	3,17 0,12	31 11	0,297 0,063
1:4	32 21	0,77 0,36	25 6	6,51 2,23	43 21	0,258 0,072
1:5	54 15	0,39 0,12	30 10	3,19 0,90	16 11	0,184 0,041

**Tab. 9.12** Fitergebnisse für die Anisotropiekurven aus Charge 2

Probe	$g_1$ ± %	$\theta_1$ ± ns	$g_2$ ± %	$\theta_2$ ± ns	$g_\infty$ ± %	$r_0$ ±
1:1	19 5	0,76 0,11	24 5	7,44 1,69	58 9	0,35 0,076
1:4	28 11	0,60 0,14	25 8	5,78 0,82	47 13	0,298 0,077

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Karl-Heinz „Charly“ Gericke für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, das interessante Forschungsthema und die allzeit gewährte fachliche Unterstützung danken.

Ferner danke ich Dr. Christof Maul für die Übernahme des Koreferats und das Interesse an dieser Arbeit.

Natürlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe „Laserchemie“ für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die interessanten Diskussionen bedanken.

Weiterer Dank geht an die Mitarbeiter der Feinmechanik- und der Elektrowerkstatt, Karl-Peter Ahrens, Torsten Himstedt, Alexander Pablocki und Bernd Sladeczek für die schnelle Anfertigung von Hilfsmitteln für die Messaufbauten und die Unterstützung bei Defekten an den elektronischen Messgeräten.

Simone Lecher möchte ich für die Abwicklung aller verwaltungstechnischen Angelegenheiten danken.

Ohne die Fragestellungen meiner Projektpartner und die Herstellung zahlreicher Proben wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie zu Stande gekommen, deshalb möchte ich mich auch bei den entsprechenden Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Advanced Ceramics der Universität Bremen und des Instituts für Partikeltechnik der Technischen Universität Braunschweig bedanken.

Da mit der Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen auch die Mithilfe in der Lehre, speziell im Grundpraktikum Physikalische Chemie, verbunden war, möchte ich mich bei Inga Schack für die reibungslose Organisation, die Unterstützung und die netten Gespräche und alljährlichen Treffen auf dem Braunschweiger Weihnachtsmarkt bedanken.

Ohne die Unterstützung, das Verständnis und den Rückhalt meiner Familie und Freunde, die mich vor allem in schwierigen Situationen immer wieder aufgebaut und motiviert haben, wäre diese Arbeit heute wohl noch nicht fertig. Vielen Dank!!!

